

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ZENI VOGLER SALLEM

ESTUDO SOBRE A PRESERVAÇÃO DE ERITRÓCITOS HUMANOS PARA
EMPREGO EM EXAMES IMUNO-HEMATOLÓGICOS E CONTROLE DE
QUALIDADE PARA A CONTAGEM DE RETICULÓCITOS

Curitiba
2011

ZENI VOGLER SALLEM

ESTUDO SOBRE A PRESERVAÇÃO DE ERITRÓCITOS HUMANOS PARA
EMPREGO EM EXAMES IMUNO-HEMATOLÓGICOS E CONTROLE DE
QUALIDADE PARA A CONTAGEM DE RETICULÓCITOS

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do
Paraná.

Orientadora : Prof.^a Titular Maria Suely Soares Leonart
Co-Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo José do Nascimento

Curitiba
2011

Sallem, Zeni Vogler

Estudo sobre a preservação de eritrócitos humanos para emprego em exames imuno-hematológicos e controle de qualidade para a contagem de reticulócitos / Zeni Vogler Sallem – Curitiba, 2011. 109 f.: il. (algumas color.); 30 cm.

Orientadora: Professora Dra. Maria Suely Soares Leonart

Coorientador: Professor Dr. Aguinaldo José do Nascimento

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2011.

Inclui bibliografia

1. Preservação de Antígenos Eritrocitários. 2. Reticulócitos. 3. Controle de Qualidade. I. Leonart, Maria Suely Soares. II. Nascimento, Aguinaldo José do. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.


CDD 612.111

TERMO DE APROVAÇÃO


ZENI VOGLER

Título: ESTUDO SOBRE A PRESERVAÇÃO DE ERITRÓCITOS HUMANOS PARA EMPREGO EM EXAMES IMUNOHEMATOLÓGICOS E CONTROLE DE QUALIDADE PARA A CONTAGEM DE RETICULÓCITOS

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.


Profa. Dra. Maria Suely Soares Leonart
Orientadora


Profa. Dra. Cidônia Lourdes Vituri
Universidade Federal de Santa Catarina


Profa. Dra. Shirley Ramos da Rosa Utiyama
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 30 de setembro de 2011.

*A Deus, meu marido, minha família e
orientadores pelo apoio, incentivo,
companheirismo, amizade e paciência.
Sem eles nada disso seria possível.*

*“A mente que se abre a uma nova
idéia jamais voltará ao seu tamanho
original”.*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me presentear com a vida e todas as suas oportunidades.

Ao meu marido pelo amor, incentivo e compreensão.

À Professora Dra. Maria Suely Soares, orientadora desta dissertação pela sabedoria, dedicação, paciência e, acima de tudo por sua inestimável amizade, fundamentais para conclusão deste trabalho.

Ao Professor Dr. Aguinaldo José do Nascimento, co-orientador desta pesquisa pela sua eterna disponibilidade e bom humor. Seus conhecimentos em estatística e informática foram inestimáveis para conclusão deste trabalho.

A Diretoria do HEMEPAR por ter entendido a importância da pesquisa.

A toda equipe do HEMEPAR, e pela hospitalidade e pelo auxílio que permitiram a realização deste estudo.

Ao farmacêutico bioquímico Sérgio Túlio Stinghen, por sua incansável colaboração, empenho e competência incomuns, que tornaram possível a realização desta pesquisa.

À farmacêutica bioquímica Caroline Louise Prochaska pela colaboração e estímulo.

À amiga Aline Emmer Ferreira Furman pelo companheirismo, apoio e incentivo.

À amiga Priscila Bacarin Hermann pelo companheirismo e por sua colaboração na avaliação das amostras, simpatia e competência incomuns.

Aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Ciências em Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de crescimento, aprendizado, realização profissional e pessoal e pela confiança em mim depositada.

À secretária do Programa Juliana, sempre prestativa, dedicada e competente.

A minha família pelo incentivo, suporte e pelo apoio incondicional em todos os momentos, valorizando meus potenciais, aconselhando e incentivando com carinho e dedicação.

Àqueles que, gentilmente, doaram sangue para a execução dos experimentos.

LISTA DE ABREVIATURAS

2,3-BPG	2,3 – bisfosfoglicerato
6-PGD	6-fosfogliconato desidrogenase
AB	albumina bovina
ACD	solução preservante de sangue composta por: ácido cítrico, citrato de sódio e glicose
ADSOL	solução aditiva contendo: adenina tamponada, glicose e manitol
AMP	adenosina-5'-monofosfato
anti-SCANT	anticorpo anti-antígeno senescente da célula
ATP	adenosina 5' trifosfato
ATPase	adenosina trifosfatase
BFU-E	unidade formadora de explosão eritróide “Burst”
CAP	<i>College of American Pathologists</i>
Meio CE	meio de conservação de eritrócitos
CEP-SD	Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná
CFU-E	unidade formadora de colônias específica para a formação de eritrócitos
CO ₂	dióxido de carbono, gás carbônico
CPD	solução aditiva contendo: citrato, fosfato e dextrose
CPDA	solução aditiva contendo: citrato, fosfato, dextrose e adenina
EB	eritroblasto basófilo
EDTA _{K3}	Etileno diamino tetracetato tripotássico
EDTA _{Na2}	Etileno diamino tetracetato dissódico
EO	eritroblasto ortocromático
EP	eritroblasto policromatófilo
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
G6-P	glicose-6-fosfato
G6-PD	glicose-6-fosfato desidrogenase
GLT	glutaraldeído
GR	glutaciona redutase
GSH	glutaciona reduzida
GSH-Px	glutaciona peroxidase
GSSG	glutaciona oxidada
HE	eritrócito maduro
HEMEPAR	Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná
ICSH	<i>International Committee for Standards in Haematology</i>
ID-Micro Typing System	reativos para pesquisa, identificação e titulação de antígenos eritrocitários
ID-Diluent 1	solução de bromelina modificada para suspensão de eritrócitos
ID-Diluent 2	LISS modificado para suspensão de eritrócitos
ID-ABO/Rh	cartão de identificação antígenos dos sistema ABO e Rh D
ID-Rh-Subgrupos+C ^w +K	cartão de identificação antígenos: C-C ^w -c-E-e-K
ID-Antigen I	cartão de identificação dos antígenos: P1-Lea-Leb-Lua-Lub
ID-Antigen II	cartão de identificação dos antígenos: k-Kpa-Kpb-Jka-Jkb
ID-Antigen III	cartão de identificação dos antígenos: M-N-S-s-Fya-Fyb
KCl	cloreto de potássio
LISS	solução de baixa força iônica
Na ₂ HPO ₄	fosfato de sódio monobásico
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
NO	óxido nítrico
NUTRICEL	solução aditiva composta por adenina glicose tamponada
OPTISOL	solução aditiva composta por adenina, glicose e manitol
PE	pró-eritroblasto
RNA	ácido ribonucléico
RT	Reticulócito
SAG	solução aditiva contendo: salina, adenina e glicose

SAG-M	solução aditiva contendo, salina, adenina, glicose e manitol
SCANT	Antígeno senescente da célula
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com sulfato de duodecil
SH	grupo sulfidril
SOD	superóxido dismutase
SP	sangue periférico
SPT	sobrevida pós-transfusional
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
VG	volume globular

RESUMO

Em hemoterapia há necessidade de triagem e identificação adequadas de antígenos eritrocitários e de seus anticorpos correspondentes, presentes no plasma de pacientes e ou doadores, tanto para a seleção de sangue apropriado para transfusão como para a investigação de reações transfusionais, da doença hemolítica do recém-nascido e de outras doenças imuno-hemolíticas, assim como em imuno-hematologia. A pesquisa de anticorpos específicos demanda a aquisição de hemácias fenotipadas preservadas. Também é de grande relevância a obtenção de amostras controle de eritrócitos para contagem de reticulócitos, exame de rotina em análises clínicas, reconhecidamente útil para avaliação da integridade funcional da medula óssea, contribui para o diagnóstico e a monitoração de doenças hematológicas. O meio de conservação de eritrócitos (meio CE), solução isosmolar contendo Na_2HPO_4 , glicose, EDTANa_2 , KCl, NaCl, citrato de sódio e albumina bovina, pode ser utilizado para o controle de qualidade no laboratório de análises e mantém os valores do eritrograma estáveis por cerca de 60 dias. Esta pesquisa teve como objetivo estudar a estabilidade da reatividade de antígenos eritrocitários preservados em meio CE; e da contagem de reticulócitos, em amostras conservadas em meio CE após fixação parcial com glutaraldeído. Para a pesquisa de antígenos foram separadas amostras de 10 ml de sangue venoso de doadores do Centro de Hemoterapia e Hematologia do Paraná (HEMEPAR), adicionadas ao meio CE, obtendo-se suspensão 40% e armazenadas em alíquotas à temperatura de 2 a 6 °C. Os eritrócitos foram testados semanalmente até 63 dias, em relação à reatividade dos antígenos eritrocitários: A, B, D, C^w , C, c, E, e, K, k, kp^b , Jk^a , Jk^b , P1, Le^a , Le^b , Lu^b , M, N, S, s, Fy^a , Fy^b e Di^a . A metodologia utilizada foi à reação com anticorpos específicos, através de técnica em gel. Para avaliar a contagem de reticulócitos, foram coletados 9 ml de sangue venoso de indivíduos adultos de ambos os sexos, selecionados aleatoriamente entre alunos e funcionários da UFPR, adicionados ao meio CE na proporção 3:1, parcialmente fixados em glutaraldeído 14 mmol/l por homogeneização constante durante 60 minutos e posterior ressuspensão em meio CE. As amostras foram armazenadas em alíquotas à temperatura de 2 a 6 °C. As contagens de reticulócitos foram realizadas semanalmente até 28 dias em equipamento Pentra DX 120 (HORIBA). Os resultados mostraram que o meio CE preservou a reatividade dos antígenos eritrocitários por 63 dias, embora decréscimo de um grau da reatividade tenha sido observado para os antígenos K, k, Le^a , S e s, após 21, 14, 14, 42 e 42 dias, respectivamente. Em relação à conservação dos reticulócitos, os resultados obtidos indicam variações não significativas ($1,8\% \pm 0,64$), o erro casual para contagem, calculado pelo coeficiente de variação, foi de 20% em 28 dias de preservação, dentro do esperado pela metodologia. Os resultados obtidos apontam para a necessidade de novos experimentos e permitem sugerir que o meio CE pode ser indicado para a preservação de antígenos eritrocitários e de reticulócitos, o que poderá contribuir para a melhoria do controle de qualidade em laboratório.

Palavras-chave: eritrócitos, antígenos, reticulócitos, preservação

ABSTRACT

In hemotherapy triage and adequate identification of erythrocyte antigens is required, as well as their corresponding antibodies present in plasma of patients and donors either for the selection of appropriate blood for transfusion or for research requirements for transfusional reactions, hemolytic disease of newborn and other immuno-hemolytic diseases or immune-hematology. The investigation for specific antibodies requires the attainment of phenotyped and preserved red blood cells. It is also of great relevance to obtain control samples for reticulocyte count, a routine examination in clinical analyses, recognizably useful for assessing the functional integrity of bone marrow, aiding in the diagnosis and monitoring of hematological diseases. The medium for conservation of erythrocytes (CE-medium), an isosmolar solution containing Na_2HPO_4 , glucose, EDTANa_2 , KCl, NaCl, sodium citrate and bovine serum albumin, can be used for quality control in the laboratory analysis since it maintains the values of erythrogram stable for about 60 days. The aim of this work was the studies on the use of the CE-medium for preservation of the erythrocyte antigens reactivity and the stability of reticulocyte count, after partial fixation with glutaraldehyde. For antigens, it were separated samples 10 ml of venous blood from donors of the Hematology and Hemotherapy Center of Paraná (HEMEPAR), added to CE-medium, yielding 40% suspension and stored in aliquots at temperature 2-6 °C. The erythrocytes were tested weekly for 63 days for the red cell antigens reactivity of A, B, D, C^w , C, c, E, e, K, k, KP^b , JK^a , JK^b , P1, Le^a , Le^b , Lu^b , M, N, S, s, Fy^a , Fy^b and Di^a . The methodology used was the reaction with specific antibodies by gel technique. To evaluate the reticulocyte count, were collected 9 ml of venous blood of individuals adults of both sexes, randomly selected among students and employees of UFPR, added to the CE-medium in the ratio 3:1, partially fixed in glutaraldehyde 14 mmol / l for constant mixing for 60 min and subsequent resuspension in the CE-medium. The samples were stored in aliquots at temperature 2-6 °C. Reticulocyte counts were performed weekly for 28 days in equipment Pentra DX 120 (HORIBA). The results obtained showed that the CE-medium has preserved the red cell antigens reactivity until 63 days, although a decrease in one score of reactivity was observed for antigens K, k, Lea, S s, after 21, 14, 14, 42 and 42 days, respectively. Regarding the conservation of reticulocytes, the results indicate no significant variations ($1.8\% \pm 0.64$, $\text{cv} = 20\%$) compared to the start of preservation, when there was exactly the same average. The results point to the need for new experiments and to suggest that the CE-medium can be indicated to the preservation of reticulocytes and red cell antigens, and may contribute to the improvement of the quality control laboratory.

Keywords: erythrocytes, antigens, reticulocyte, preservation

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ERITROPOIES	21
FIGURA 2 -	REPRESENTAÇÃO DO METABOLISMO DA GLICOSE NO ERITRÓCITO.....	24
FIGURA 3 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MEMBRANA PLASMÁTICA DO ERITRÓCITO	26
FIGURA 4 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS LIGADOS A MEMBRANA PLASMÁTICA DO ERITRÓCITO.....	32
FIGURA 5 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE ANTÍGENOS DE GRUPOS SANGÜÍNEOS CONFORME SUAS FUNÇÕES	34
FIGURA 6 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA FORMAÇÃO DOS ANTÍGENOS A e B.....	35
FIGURA 7 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PROTEÍNA Rh	38
FIGURA 8 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS GENES RHD e RHCE.....	39
FIGURA 9 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS ANTÍGENOS Le ^a e Le ^b E SEUS PRECURSORES	42
FIGURA 10 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS ANTÍGENOS Fy ^a e Fy ^b	44
FIGURA 11 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS ANTÍGENOS Jk ^a e Jk ^b	44
FIGURA 12 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS ANTÍGENOS Di ^a e Di ^b / Wr ^a e Wr ^b	45
FIGURA 13 -	ASPECTO MORFOLÓGICO DE RETICULÓCITOS	46
FIGURA 14 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO DISCO DE MILLER PARA CONTAGEM DE RETICULÓCITOS AO MICROSCÓPIO ÓTICO.....	49
FIGURA 15 -	REPRESENTAÇÃO SISTEMA DE LEITURA DE CÉLULAS EM EQUIPAMENTOS ELETRÔNICOS.....	50
FIGURA 16 -	REPRESENTAÇÃO SISTEMA DE LEITURA DE RETICULÓCITOS EM EQUIPAMENTOS ELETRÔNICOS.....	51
FIGURA 17 -	REPRESENTAÇÃO SISTEMA DE LEITURA DE RETICULÓCITOS EM EQUIPAMENTOS ELETRÔNICOS.....	51
FIGURA 18 -	ID-ABO/Rh DE ANTISOROS ESPECÍFICOS PARA ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS DOS TIPOS A-B-AB-D-CDE-ctl.....	61
FIGURA 19 -	ID-Rh-Subgrupos+C ^w +K DE ANTISOROS ESPECÍFICOS PARA ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS DOS TIPOS C-C ^w -c-E-e-Kell	61
FIGURA 20 -	ID-PERFIL I DE ANTISOROS ESPECÍFICOS PARA ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS DOS TIPOS P ¹ -Le ^a -Le ^b -Lu ^a -Lu ^b -ctl.....	62
FIGURA 21 -	ID-PERFIL II DE ANTISOROS ESPECÍFICOS PARA ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS DOS TIPOS k-Kp ^a -Kp ^b -Jk ^a -Jk ^b -ctl.....	62

FIGURA 22 -	ID-PERFIL III DE ANTISOROS ESPECÍFICOS PARA ANTÍGENOS EROITROITÁRIOS DOS TIPOS M-N-S-S-FYA-FYB	62
FIGURA 23 -	POSITIVIDADE PARA ANTÍGENOS EROITROITÁRIOS: REAÇÃO 4+ (FORTEMENTE POSITIVA)	65
FIGURA 24 -	POSITIVIDADE PARA ANTÍGENOS EROITROITÁRIOS: REAÇÃO 3+ (POSITIVA)	65
FIGURA 25 -	POSITIVIDADE PARA ANTÍGENOS EROITROITÁRIOS: REAÇÃO 2+ (MODERADAMENTE POSITIVA)	66
FIGURA 26 -	POSITIVIDADE PARA ANTÍGENOS EROITROITÁRIOS: REAÇÃO 1 + (FRACAMENTE POSITIVA)	66
FIGURA 27 -	REAÇÃO NEGATIVA PARA ANTÍGENOS EROITROITÁRIOS	67
FIGURA 28 -	POSITIVIDADE PARA ANTÍGENOS Le ^b , DURANTE A PRESERVAÇÃO DE EROITÓITOS EM MEIO CE	72
FIGURA 29 -	GRAU MÉDIO DE REATIVIDADE DOS ANTÍGENOS A, B, D, C ^w , C, e, Jk ^a , Le ^b , Lu ^b , M, N EM EROITRÓITOS PRESERVADOS EM MEIO CE	74
FIGURA 30 -	GRAU MÉDIO DE REATIVIDADE DOS ANTÍGENOS c, Jk ^b , P1, Fy ^a , Di ^a , E, Kp ^b EM EROITRÓITOS PRESERVADOS EM MEIO CE	74
FIGURA 31 -	GRAU MÉDIO DE REATIVIDADE DO ANTÍGENO Fy ^b EM EROITRÓITOS PRESERVADOS EM MEIO CE.....	75
FIGURA 32-	GRAUS DE REATIVIDADE DO ANTÍGENO K EM EROITRÓITOS PRESERVADOS EM MEIO CE	75
FIGURA 33 -	GRAUS DE REATIVIDADE DO ANTÍGENO k EM EROITRÓITOS PRESERVADOS EM MEIO CE	75
FIGURA 34 -	GRAUS DE REATIVIDADE DO ANTÍGENO S EM EROITRÓITOS PRESERVADOS EM MEIO CE	76
FIGURA 35 -	GRAUS DE REATIVIDADE DO ANTÍGENO s EM EROITRÓITOS PRESERVADOS EM MEIO CE	76
FIGURA 36 -	GRAUS DE REATIVIDADE DO ANTÍGENO Le ^a EM EROITRÓITOS PRESERVADOS EM MEIO CE	76
FIGURA 37 -	CONTAGENS DE RETICULÓITOS POR AMOSTRA DE EROITRÓITOS PARCIALMENTE FIXADOS EM GLUTARALDEÍDO E PRESERVADOS EM MEIO CE DURANTE 28 DIAS.....	78
FIGURA 38 -	CONTAGENS AUTOMATIZADAS DE RETICULÓITOS POR TEMPO DE PRESERVAÇÃO DE EROITRÓITOS MEIO CE, APÓS FIXAÇÃO PARCIAL EM GLUTARALDEÍDO	79

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - SISTEMAS SANGUÍNEOS DE MAIOR SIGNIFICÂNCIA CLÍNICA.....	33
TABELA 2 - TERMINOLOGIAS UTILIZADAS PARA NOMINAR OS ANTÍGENOS DO SISTEMA Rh.....	40
TABELA 3 - HAPLÓTIPOS BASEADOS NA PRESENÇA DOS ANTÍGENOS DO SISTEMA Rh.....	41
TABELA 4 - CONTAGEM MANUAL DE RETICULÓCITOS: INFLUÊNCIA DA PORCENTAGEM DE ERRO E NÚMERO DE ERITRÓCITOS NA EXATIDÃO DAS CONTAGENS	49
TABELA 5 - CORRELAÇÃO INTRA-CLASSES DE ANTÍGENOS DURANTE 63 DIAS DE PRESERVAÇÃO DE ERITRÓCITOS EM MEIO CE DE ACORDO COM O GRAU DE POSITIVIDADE AO LONGO DO TEMPO	73
TABELA 6 - CONTAGEM MANUAL DE RETICULÓCITOS EM AMOSTRAS DE ERITRÓCITOS PARCIALMENTE FIXADOS EM GLUTARALDEÍDO E PRESERVADOS EM MEIO CE (N=4).....	77
TABELA 7 - CONTAGEM AUTOMATIZADA DE RETICULÓCITOS EM AMOSTRAS, DE ERITRÓCITOS PARCIALMENTE FIXADOS EM GLUTARALDEÍDO E PRESERVADOS EM MEIO CE (N=10).....	77
TABELA 8 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA MODELO FATORIAL COM DOIS CRITÉRIOS PARA A CONTAGEM DE RETICULÓCITOS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CONSERVAÇÃO	78
TABELA 9 - TABELAS DE MÉDIAS DAS CONTAGENS AUTOMATIZADAS DE RETICULÓCITOS POR AMOSTRAS E POR DIA DE PRESERVAÇÃO DE ERITRÓCITOS EM MEIO CE, APÓS FIXAÇÃO PARCIAL EM GLUTARALDEÍDO.....	79

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	SÉRIE ERITRÓIDE	20
2.2	METABOLISMO ERITROCITÁRIO.....	22
2.3	MEMBRANA ERITROCITÁRIA.....	23
2.4	SISTEMA ANTIOXIDANTE DO ERITRÓCITO	27
2.5	ENVELHECIMENTO ERITROCITÁRIO.....	28
2.6	LESÃO DE ESTOQUE.....	29
2.7	HISTÓRIA DA HEMOTERAPIA	30
2.8	SISTEMAS DE GRUPOS SANGÜÍNEOS	32
2.9	RETICULÓCITO.....	45
2.10	MEIOS PARA PRESERVAÇÃO E FIXAÇÃO CELULAR	52
3.	OBJETIVOS	56
3.1	OBJETIVO GERAL	57
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	57
4.	MATERIAL E MÉTODOS	58
4.1	MATERIAL.....	59
4.1.1	Para ensaios de antígenos eritrocitários.....	59
4.1.2	Para ensaios de contagem de reticulócitos	59
4.2	MÉTODOS	60
4.2.1	Preparo do meio CE.....	60
4.2.2	Preparo de amostras para pesquisa de antígenos eritrocitários	60
4.2.3	Procedimento dos testes imuno-hematológicos	63
4.2.3.1	Preparo das suspensões de eritrócitos.....	63
4.2.3.2	Técnica de fenotipagem dos antígenos	64
4.2.3.3	Procedimento para leitura dos cartões de identificação de antígenos	65
4.2.4	Preparo de amostras para contagem de reticulócitos	67
4.2.4.1	Coleta das amostras	67
4.2.4.2	Contagem manual de reticulócitos.....	68
4.2.4.3	Contagem automatizada de reticulócitos.....	69
4.3	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	70
5.	RESULTADOS.....	71
5.1	PRESERVAÇÃO DE ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS.....	72
5.2	PRESERVAÇÃO DA CONTAGEM DE RETICULÓCITOS.....	77
6.	DISCUSSÃO	80
7.	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS.....	93
	ANEXOS	104

ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	105
ANEXO 2 – PROTOCOLO CEP/SD	108



1 INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

No laboratório de análises clínicas são realizados vários procedimentos para avaliação clínica nos diversos materiais biológicos em seus diferentes setores. É de fundamental importância controlar a qualidade em todas as fases que compõem o roteiro para a obtenção de um diagnóstico adequado às necessidades do paciente e do profissional que solicitou informações para subsidiar a terapêutica.

O envelhecimento e a preservação dos elementos figurados do sangue, especialmente eritrócitos e plaquetas, tem sido estudados com diferentes finalidades, incluindo o seu emprego em hemoterapia e a obtenção de amostras estáveis para o controle de qualidade em hematimetria (LEONART *et al.*, 1989; 1992; 1994; 1999.; EMENDÖRFER *et al.*, 1998; 1999; 2000., PROCHASKA *et al.*, 2001; 2002; 2003, HAUSER *et al.*, 2003a; 2003b; 2004., FEISTLER *et al.*, 2004; 2005., SALMAZO NEIVA *et al.*, 2006; 2007; 2008).

A garantia e o controle de qualidade são imprescindíveis para a certificação das análises laboratoriais, além de conferir a confiabilidade dos resultados diagnósticos. Para tal, é necessário que os profissionais do laboratório tenham acesso ao conhecimento de procedimentos operacionais padronizados para a conservação de células.

O meio de conservação de eritrócitos (meio CE), isosmolar e composto de fosfato de sódio monobásico (Na_2HPO_4), glicose, etileno diamino tetracetato dissódico (EDTANa_2), cloreto de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl), citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), albumina bovina (AB), antibióticos e cortisona (LEONART *et al.*, 1986), já foi amplamente estudado, buscando-se o entendimento da função e relevância de cada um de seus constituintes, bem como a sua simplificação, através da retirada de alguns de seus componentes, e na metodologia de preparo das amostras para controle de qualidade em hematimetria. Desde 1986, os resultados obtidos em diversos trabalhos têm mostrado que o meio CE para preservação de eritrócitos e plaquetas pode ser utilizado para o controle de qualidade no laboratório de análises, setor de hematologia, visando contribuir para resultados mais precisos e eficientes (LEONART, 1994).

É incontestável a relevância da detecção de antígenos eritrocitários e de seus respectivos anticorpos para o sucesso de transfusões sanguíneas e para o diagnóstico de algumas doenças hemolíticas. No entanto, constata-se as

necessidades, tanto em centros de hemoterapia quanto em laboratórios de rotina de análises clínicas, de amostras controle de eritrócitos com antígenos conhecidos estáveis por longos períodos, especialmente aqueles mais raros na população. A partir deste conhecimento, surge o interesse em se investigar a estabilidade de antígenos de maior importância em imuno-hematologia na superfície de eritrócitos preservados. Neste sentido, como o meio CE, quando empregado como solução preservadora, mantém os valores do eritrograma estáveis por cerca de 60 dias, optou-se por empregá-lo também em investigações relacionadas à estabilidade de tais antígenos.

Da mesma forma, a contagem de reticulócitos é uma determinação laboratorial extremamente importante para a investigação da capacidade de produção da série vermelha pela medula óssea no diagnóstico das anemias. Há dificuldades no laboratório para o controle de qualidade da contagem de reticulócitos no que se refere à padronização da contagem manual e na obtenção de amostras controle, tanto para contagens manuais quanto automatizadas (SIMIONATTO, *et al.*, 2009). Assim, torna-se relevante o estudo da estabilidade dos reticulócitos em amostras de eritrócitos preservados em meio CE, parcialmente fixados com glutaraldeído.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Revisão de literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

O estudo da morfologia, fisiologia e metabolismo dos eritrócitos tem sido realizado com diversas finalidades, dentro de campos como a hemoterapia, o controle de qualidade em hematimetria, a imunologia, e a bioquímica (MORGAN, 1978; BEUTLER, 1984; LEWIS *et al.*, 2006).

A contagem de eritrócitos, bem como os outros valores do eritrograma, fazem parte do hemograma, um dos exames mais solicitados aos laboratórios clínicos, sendo um coadjuvante útil em todas as especialidades médicas, por contemplar a avaliação quantitativa e qualitativa dos elementos figurados do sangue (SILVA & HASHIMOTO, 1999; 2003).

A partir da década de 80, aumentou no Brasil o uso de contadores eletrônicos de células, equipamentos que passaram a fazer parte da rotina diária dos laboratórios de análises clínicas. Sedimentou-se, assim, a preocupação com o controle de qualidade interno, neste setor, uma vez que tais equipamentos precisam ser monitorados continuamente (SILVA & HASHIMOTO, 1999; 2003).

O controle de qualidade em laboratório de análises clínicas é atualmente reconhecido como necessário para assegurar aos usuários que os resultados dos seus exames sejam fidedignos. Em hematologia, o controle de qualidade exige o emprego de amostras preservadas para a validação das análises e a comprovação da exatidão e da reprodutibilidade dos resultados, demonstrando assim a confiabilidade (LEONART, 1994).

O conhecimento tecnológico para a obtenção de suspensões de células preservadas e adequadas ao controle de qualidade não é de domínio público. Com o propósito de preparar amostras estáveis para as determinações do eritrograma, foi desenvolvida uma solução preservadora de eritrócitos, isosmolar, denominada meio CE (LEONART, *et al.*, 1986).

Segundo LEONART *et al.* (1989), eritrócitos parcialmente fixados em glutaraldeído e ressuspensos em meio CE permanecem estáveis em amostras adequadas ao emprego em controle de qualidade para os valores do eritrograma por até 100 dias.

Segundo Kaushansky, *et al.* (2010), a maturação dos reticulócitos na circulação periférica é de 24 a 48 horas em um processo normal. Neste período ocorre desagregação progressiva dos ribossomos e mitocôndrias, passando ao

último estágio de eritrócito maduro. Em soluções de preservação e em condições refrigeradas de armazenamento, o metabolismo eritrocitário, embora mais lento, se mantém. Assim, o processo maturativo da célula continua, o que dificulta a produção de suspensões controle para contagem de reticulócitos. Segundo Tsuda & Tatsumi (1990), a estabilidade dos reticulócitos *in vitro* é baixa e a contagem deve ser realizada em até 72 horas, mesmo quando as amostras são armazenadas refrigeradas entre 2 e 6 °C.

De maneira similar, pesquisadores do setor de imuno-hematologia buscam incansavelmente a padronização de técnicas e reagentes que possibilitem o controle de qualidade, a fim da obtenção de análises seguras e confiáveis.

Assim, a obtenção de suspensões de eritrócitos estáveis que mantenham todas as suas características físicas, químicas e morfológicas podem proporcionar melhorias na qualidade de serviços de hematologia e imuno-hematologia.

2.1 SÉRIE ERITRÓIDE

A célula totipotente, após várias divisões mitóticas, diferencia-se em uma célula unipotente denominada Unidade Formadora Eritróide ou *Burst Forming Unit* (BFU-E), capaz de iniciar o desenvolvimento específico da célula vermelha. Transforma-se, em seguida, em Unidade Formadora de Colônias Eritróide ou *Colony Forming Unit* (CFU-E) que, por efeito da eritropoetina, transforma-se na primeira célula vermelha reconhecida à microscopia ótica, chamada pró-eritroblasto (PE). Cada PE sofre várias divisões mitóticas, gerando células mais diferenciadas, eritroblastos basófilos (EB), eritroblasto policromatófilo (EP), eritroblasto ortocromático (EO), reticulócito (RT) e, finalmente, hemácia ou eritrócito maduro (HE) (Figura 1) (LORENZI, 2006a; GREER, *et al.*, 2009; KAUSHANSKY, *et al.*, 2010).

Na fase madura de eritrócito, já foram perdidos o núcleo e organelas, como retículo endoplasmático, mitocôndrias e ribossomos. Dessa forma, o eritrócito maduro é incapaz de sintetizar proteínas (LORENZI, 2006a; GREER, *et al.*, 2009;).

O processo de divisão e maturação da célula vermelha leva em torno de três a cinco dias. Esta permanece na medula óssea até o estágio de reticulócito quando é liberada no sangue periférico (SP), permanecendo nesta forma por um a dois dias, até se tornar hemácia madura, a qual tem uma vida média de 120 dias na

circulação. O eritrócito humano é uma célula simples, com forma de disco bicôncavo, de aproximadamente 8 µm de diâmetro, com flexibilidade fisiológica notável, cuja função essencial é transportar oxigênio aos tecidos através da hemoglobina (LEWIS *et al.*, 2006), apresentando características de deformabilidade e superfície ideais para o transporte e a trocas de gases (GREER *et al.*, 2009).

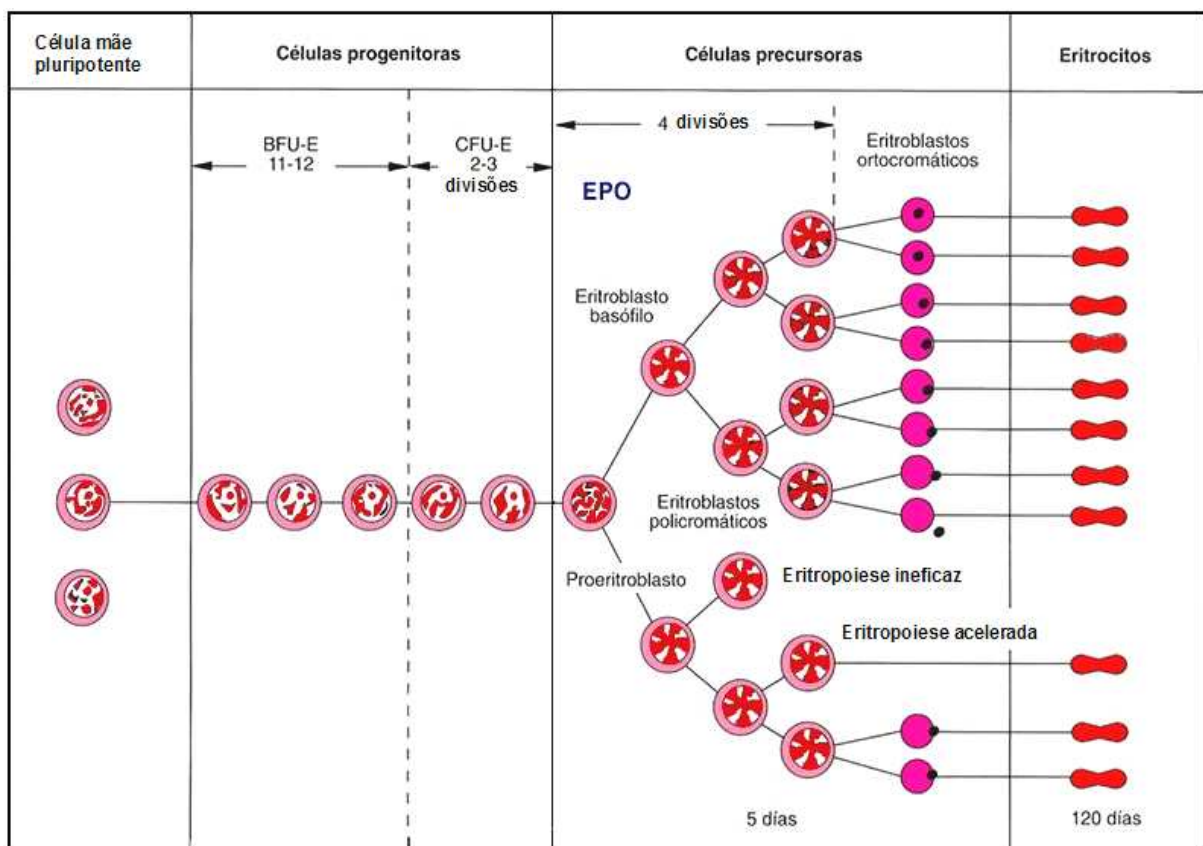


FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ERITROPOIESE

FONTE: Adaptada de: A Série Vermelha (2011)

Disponível em: <http://misodor.com/SERIE%20VERMELHA.php>

A principal função do eritrócito é o transporte de oxigênio (O_2) dos pulmões aos tecidos, onde ocorre a troca pelo dióxido de carbono (CO_2). Este transporte é otimizado através de efeitos sinérgicos da hemoglobina, da anidrase carbônica e da proteína banda 3 da membrana, seguida pela entrega de CO_2 aos pulmões para sua liberação (KLEINBONGARD *et al.*, 2006).

Além da função de transporte das moléculas de O_2 e CO_2 , o eritrócito também tem um papel importante na regulação da vasodilatação. No caso de

hipóxia nos tecidos, o eritrócito, envolvendo adenosina 5' trifosfato (ATP) e óxido nítrico (NO), parece estar implicado com o aumento da vascularização (KLEINBONGARD *et al.*, 2006).

2.2 METABOLISMO ERITROCITÁRIO

A célula eritrocitária, enquanto nucleada, apresenta metabolismo aeróbico e anaeróbico e, na fase madura, apenas o anaeróbico. As três principais vias metabólicas do eritrócito são: a glicólise, o ciclo das pentoses e o metabolismo das purinas (Figura 2) (SHONAT & JOHNSON, 1997). A entrada da molécula de glicose na célula ocorre por intermédio de transportadores de membrana tipo GLUT 1, independentes de insulina. Em condições normais, aproximadamente 90% da glicose que penetra na célula é metabolizada pela glicólise e o restante pela via das pentoses. Em situação de estresse oxidativo, a situação metabólica pode ser invertida (GREER *et al.*, 2009).

Os produtos mais importantes gerados pela glicólise são: duas moléculas de ATP, duas moléculas de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) e uma molécula de 2,3 - bisfosfoglicerato (2,3-BPG), através do desvio de Luebering-Rapoport (KLINKEN, 2002).

As enzimas reguladoras da glicólise são a hexoquinase, a fosfofrutoquinase e a piruvatoquinase, as quais são submetidas à complexa modulação alostérica (GRIMES, 1980). A hexoquinase é inibida pela glicose-6-fosfato (G6-P) e estimulada pelo substrato ATP-Mg (KLINKEN, 2002).

O ATP, principal fonte de energia, é necessário para a manutenção do equilíbrio hidroeletrolítico, aciona as bombas de cátions e mantém a forma eritrocitária e a capacidade de deformação da membrana, possivelmente por fosforilação da espectrina, além de modular a quantidade de 2,3-BPG gerada (STIENE-MARTIN *et al.*, 1998). A energia liberada por este composto é utilizada indiretamente para a regeneração de compostos vitais para o eritrócito, tais como glutatona reduzida (GSH), NADH, flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e adenosina-5'-monofosfato (AMP) (BEUTLER, 1984). O NADH é co-fator enzimático em algumas etapas da glicólise e na reação de conversão da meta-hemoglobina a

hemoglobina, isto é, na redução da meta-hemoglobina pela enzima meta-hemoglobina redutase (KLINKEN, 2002).

O ciclo das pentoses consome cerca de 5 a 10% da glicose eritrocitária e promove a manutenção de níveis adequados de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH), por ação das enzimas glicose 6-fosfato desidrogenase (G6-PD) e 6-fosfogliconato desidrogenase (6-PGD), e de glutathiona reduzida (GSH), que protegem a hemoglobina e componentes da membrana celular contra a peroxidação. O NADPH é a coenzima utilizada na redução de glutathiona oxidada (GSSG) pela ação da enzima glutathiona redutase (GR). A peroxidação lipídica é iniciada por espécies ativas de oxigênio, com formação de dienos conjugados a partir de ácidos graxos poliinsaturados, por rearranjos de duplas ligações. A inserção de oxigênio na molécula dos dienos leva à quebra em lipoperóxidos e ou malonildialdeído, seu produto final (NELSON & COX, 2006).

O equilíbrio hidroeletrolítico do eritrócito pode ser considerado como índice da função da adenosina trifosfatase (ATPase) da membrana e, de modo mais genérico, do estado de integridade do eritrócito (FAGIOLO, 1986). As bombas que regulam a entrada e a saída de cátions contra gradientes de concentração dependem de ATP e são controladas por Na^+/K^+ e $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPases, as quais são firmemente ligadas à membrana. Assim, baixos níveis de ATP acarretam modificações danosas para a célula, tais como a diminuição da atividade da bomba Na^+/K^+ ATPase e a da capacidade de síntese e reacilação de fosfolipídeos (GRIMES, 1980).

Com a redução do funcionamento da bomba de Na^+/K^+ , a membrana celular deixa de realizar trocas de íons entre o eritrócito e o meio extracelular, comprometendo também a expulsão de moléculas de H_2O , que é realizada em conjunto com sua propriedade osmótica (KLEIN *et al.*, 2007).

2.3 MEMBRANA ERITROCITÁRIA

A membrana do eritrócito, assim como outras membranas biológicas, é responsável pelo controle da entrada e saída de substâncias da célula e pela manutenção da constância do meio intracelular, possuindo um sistema estrutural complexo.

Via Embden - Meyerhof
(Via anaeróbica do metabolismo da glicose)

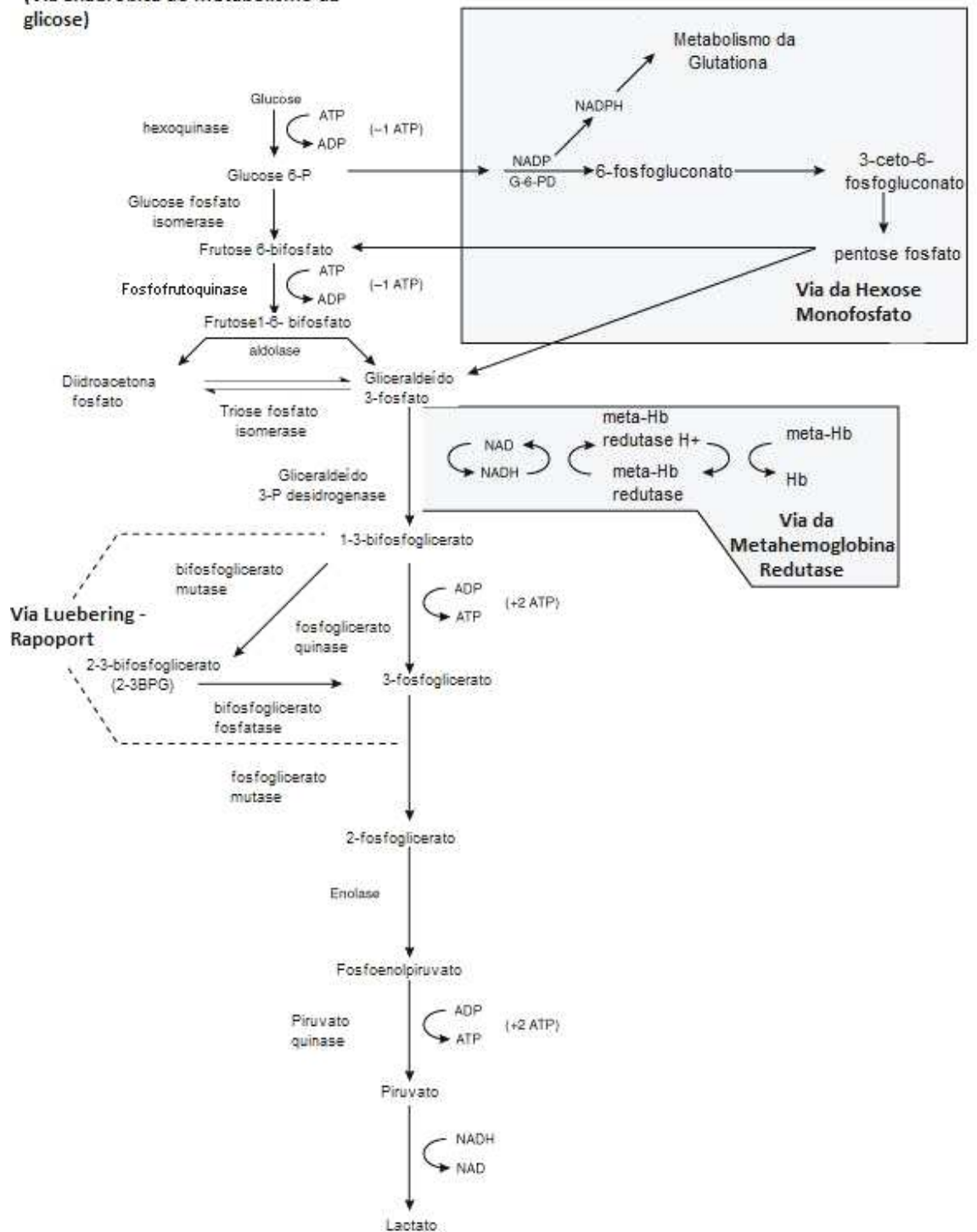


FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO DO METABOLISMO DA GLICOSE NO ERITRÓCITO

FONTE: Red Cell Biology (2011). Disponível em:

<http://faculty.washington.edu/calvoc/DocumentsLabM321/Lectures/3RBC.ppt>

O citoesqueleto é um dos responsáveis pela forma da célula, além de influir sobre a sua mobilidade, deformabilidade e transporte de macromoléculas. Entre os diferentes constituintes da membrana apresentam-se receptores envolvidos em funções complexas que permitem a comunicação entre as células e o reconhecimento imunológico, além de manter um mecanismo externo de não reagir com o meio exterior, não aderindo às células endoteliais ou agregarem-se entre si podendo causar oclusão dos vasos da microcirculação (GREER, *et al.*, 2009; KAUSHANSKY *et al.*, 2010).

A estrutura trilaminar da membrana é constituída por aproximadamente 52% de proteínas, 40% de lipídios e 8% de carboidratos (GREER, *et al.*, 2009). Os tipos predominantes de fosfolipídios primários são a fosfatidiletanolamina (27%) e a fosfatidilserina (13%), na face interna da membrana; a fosfatidilcolina (28%) e a esfingomielina (26%), mais abundantes na face externa da membrana. Em geral, substâncias de baixa polaridade atravessam livremente a membrana do eritrócito, enquanto moléculas polares dependem de transporte através de sítios especializados (NELSON & COX, 2006; KAUSHANSKY *et al.*, 2010).

A porção protéica da membrana eritrocitária é constituída por diversas proteínas que atravessam a bicamada lipídica, chamadas de proteínas integrais ou transmembranosas e proteínas situadas na base da bicamada lipídica, que compõem o citoesqueleto, chamadas de proteínas periféricas (Figura 3) (NELSON & COX, 2006; KAUSHANSKY *et al.*, 2010).

As proteínas periféricas encontram-se fixadas à face interna da bicamada lipídica, interligadas entre si formando o citoesqueleto. Dentre elas estão a espectrina, a anquirina (proteína 2.1), as proteínas 4.1, 4.2 e 4.9, a actina (banda 5), a aducina e as bandas 6 e 7. A interação dessas proteínas do citoesqueleto com a bicamada lipídica e com as proteínas integrais da membrana são responsáveis pela flexibilidade e deformabilidade do eritrócito. As proteínas integrais são representadas pela banda 3, glicoforinas e banda 4.5 (MURADOR & DEFFUNE, 2007; KAUSHANSKY *et al.*, 2010).

A proteína Banda 3 é uma glicoproteína transmembranosa que atua como o principal transportador de ânions da membrana eritrocitária, responsável pelas trocas cloreto/bicarbonato, sendo a maior proteína integral, atravessando a membrana cerca de 12 vezes (LORENZI, 2006a).

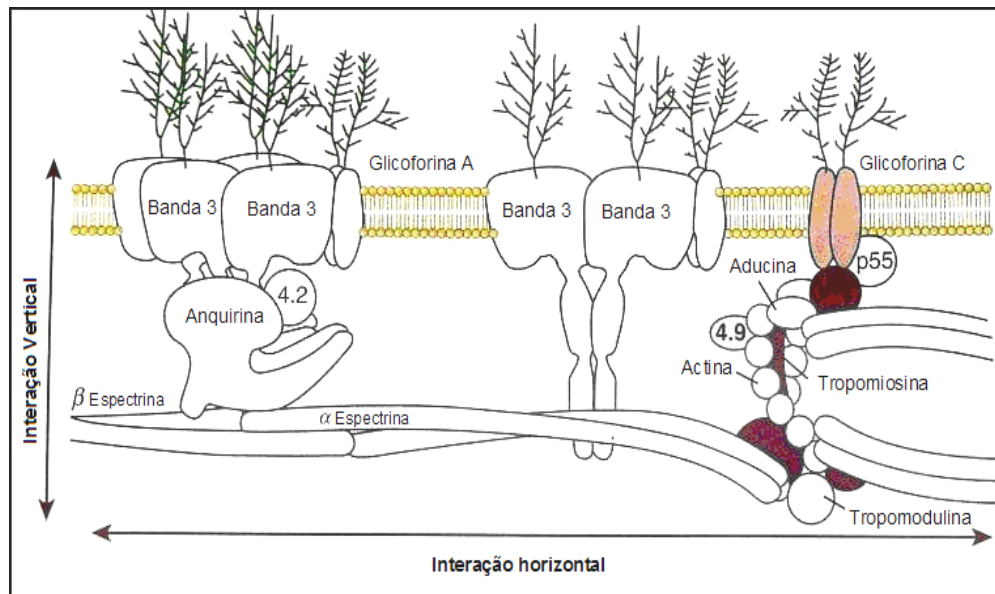


FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MEMBRANA PLASMÁTICA DO ERITRÓCITO
 FONTE: Adaptada de KAUSHANSKY *et al.* (2010)

A proteína Banda 3 mantém uma ligação importante com as proteínas periféricas anquirina e espectrina, que serve para fixar a membrana ao citoesqueleto e atua como um regulador contínuo de íons, promovendo a deformabilidade do eritrócito por determinar maior flexibilidade ou rigidez da membrana e, possivelmente regulando também a senescência do eritrócito (KAUSHANSKY *et al.*, 2010). No domínio extracelular da proteína estão os antígenos de diversos grupos sanguíneos como: Diego, Wright e diversos outros tipos de antígenos de menor ocorrência (LORENZI, 2006a; KAUSHANSKY *et al.*, 2010).

As glicoforinas são as glicoproteínas integrais mais abundantes na membrana dos eritrócitos, atuam na regulação da estabilidade, deformabilidade e forma da membrana. As glicoforinas possuem carboidratos na porção externa da molécula, sendo que a presença destes confere carga negativa aos eritrócitos e impede a aglutinação dos mesmos. A porção externa das glicoforinas apresentam grupamentos que servem como receptores para diversos agentes infecciosos como *Plasmodium falciparum*, além de carregar antígenos de diversos grupos sanguíneos como: M, N, Ss, Miltenberger V, Gerbich, 1' entre outros de menor incidência (LORENZI, 2006a; MURADOR & DEFFUNE, 2007; GREER, *et al.*, 2009).

Quaisquer mudanças nos componentes da membrana, tanto na porção lipídica, como na porção protéica, pode culminar com alterações na forma, levando a uma diminuição da resistência aos insultos metabólicos e mecânicos que estas

células sofrem constantemente na circulação, causando o aumento da sua destruição ou hemólise (NELSON & COX, 2006).

Assim como em outras membranas, no eritrócito a maioria das moléculas precisa de mecanismos de transporte. Conseqüentemente, vários sistemas de proteínas transportadoras de membrana são utilizados para a movimentação de moléculas para fora e para dentro da célula (MURADOR & DEFFUNE, 2007).

O transporte de Na^+/K^+ é mediado pela bomba de Na^+/K^+ ATPase, visto que a diminuição do ATP leva à falha da bomba de Na^+K^+ , com aumento da saída de K^+ e da entrada de Na^+ (NELSON & COX, 2006; KLEIN *et al.*, 2007).

O excesso de cálcio Ca^{2+} intracelular é deletério ao eritrócito e por isso, o mesmo é ativamente transportado para fora da célula através de uma bomba ATPase dependente de magnésio Mg^{2+} . A bomba de cálcio é ativada por uma proteína ligante de cálcio, a calmodulina (GREER, *et al.*, 2009).

O transporte de aminoácidos nos eritrócitos garante a síntese de GSH nestas células, além de ser responsável pelo efluxo de aminoácidos durante a maturação do reticulócito (GREER, *et al.*, 2009).

O transporte da glicose para dentro do eritrócito ocorre de forma passiva, pelo transportador de glicose tipo 1 (GLUT-1). Esta proteína compõem cerca de 5% do total de proteínas da membrana do eritrócito (NELSON & COX, 2006).

2.4 SISTEMA ANTIOXIDANTE DO ERITRÓCITO

O eritrócito possui estruturas metabólicas para manter a hemoglobina no seu estado funcional, transportando assim, grande quantidade de oxigênio sem alterar sua integridade, através de um complexo sistema de destoxificação, que proporciona a eliminação de radicais livres e de outras espécies altamente reativas. O tampão redox do eritrócito é representado por GSH, tripeptídeo formado por resíduos de glicina, glutamato e cisteína, sendo este último aminoácido portador do grupo sulfidril (SH), grupo empregado nas reações de óxido-redução nas quais aquela molécula participa (STRYER, 1995; NELSON & COX, 2006).

A GSH é responsável por manter componentes diversos da célula em estado reduzido, especialmente proteínas e íons Fe^{++} de grupos heme, atuando também como um nucleófilo, com reatividade para se combinar com várias drogas, gerando

metabólitos que facilitam a excreção urinária ou biliar (NELSON & COX, 2006). O mecanismo redox de remoção de peróxidos e de outros derivados reativos do O₂ envolve a oxidação da GSH, gerando glutathiona oxidada (GSSG). A reação de dimerização da GSH é catalisada pela glutathiona peroxidase (GSHPx), uma das raras enzimas que utilizam o elemento selênio. A regeneração da GSSG por redução é realizada pela glutathiona redutase (GR), que utiliza nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) como fonte de elétrons. O NADPH é gerado em uma via alternativa do metabolismo da glucose, o ciclo das pentoses fosfato ou via das hexoses monofosfato. Deficiências ou comprometimentos nas enzimas deste metabolismo, especialmente a G6-PD, aumentam enormemente a suscetibilidade do eritrócito ao estresse oxidativo (JANDL, 1996).

A enzima superóxido dismutase (SOD) produz peróxido de hidrogênio a partir do ânion superóxido. A catalase remove o peróxido de hidrogênio. A hemoglobina auto-oxidada pode ser convertida à desoxihemoglobina pela metahemoglobina redutase, enzima esta, NADH dependente (HARRIS, 1991).

O eritrócito possui mecanismos metabólicos necessários para transportar redutores através de sua membrana para fora da célula. A atividade de oxirredutase transmembrana está relacionada à manutenção do estado redox de proteínas, neutralização de agentes oxidantes externos e reciclagem da vitamina E na membrana (MAY, 1999).

2.5 ENVELHECIMENTO ERITROCITÁRIO

Os eritrócitos passam por mudanças metabólicas e físicas associadas com o processo de envelhecimento, no qual se observam vesiculação da membrana, diminuição no tamanho da célula, aumento da densidade intracelular, alterações do citoesqueleto, perda de co-fatores enzimáticos, e exposição de fosfatidilserina (KLEIN & ANSTEE, 2005).

O tempo de vida de eritrócitos saudáveis na circulação sangüínea é em torno de 110 a 120 dias. À medida que estas células vão envelhecendo, tornam-se gradualmente mais densas, provavelmente por perda de material de membrana (MOHANDAS & CHASIS, 1993). Anteriormente, acreditava-se que a perda ou a diminuição da flexibilidade da célula, induziam a sua fagocitose nos estreitos canais

do baço e fígado, resultando em sua retirada da circulação (DERICK *et al.*, 1992). Porém, apesar de a membrana mais rígida propicia a eliminação do eritrócito, há evidências experimentais de que o principal mecanismo seja outro (BRATOSIN *et al.*, 2002). Uma alteração na proteína banda 3 da membrana celular leva à formação de um neo-antígeno, denominado antígeno senescente de célula (SCANT) (KLEIN & ANSTEE, 2005). A ligação subsequente de um anticorpo anti-antígeno senescente da célula (anti-SCANT) presente no plasma, provavelmente em maior concentração pela atividade do sistema complemento, fornece um sinal forte para fagocitose, que ocorre predominantemente no baço (SCOTT *et al.*, 2005).

2.6 LESÃO DE ESTOQUE

Lesão de estoque são as alterações que ocorrem no eritrócito durante sua preservação, que podem causar mudanças ou danos e provocar a diminuição da sobrevida pós-transfusional (SPT) (CHIN-YEE *et al.*, 1997).

Durante o armazenamento, sob baixas temperaturas (4 a 6° C), o metabolismo eritrocitário fica lento e há redução da atividade metabólica, através da desaceleração dos processos bioquímicos e das reações moleculares (KIRBY *et al.*, 2005). Inicialmente, a glicólise é acelerada com maior produção de ATP, em seguida ocorre maior consumo e conseqüente queda na quantidade de glicose, com diminuição da concentração de ATP, levando a acúmulo de ácido láctico e redução gradativa do pH e, assim, redução da atividade enzimática (HESS & GREENWALT, 2002). A queda no pH causa redução dos níveis de 2,3-BPG, que resulta em aumento da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, com conseqüente diminuição da capacidade destas células em fornecer oxigênio aos tecidos.

A diminuição da oferta de ATP acarreta falha das ATPases, levando à parada da bomba de sódio e potássio, com acúmulo de potássio intra e sódio extracelular. Há diminuição de GSH, com formação de meta-hemoglobina e oxidação de lipídios e proteínas. Alterações morfológicas são descritas em eritrócitos preservados *in vitro*, correlacionadas com a diminuição da relação área de superfície/volume e da deformabilidade, e com aumento da viscosidade e rigidez da membrana, levando à formação de esferócitos. Com o rompimento da membrana,

ocorre hemólise com conseqüente aumento da hemoglobina extracelular (MERYMAN *et al.*, 1986; WEGNER *et al.*, 1987; LEONART, 1994).

2.7 HISTÓRIA DA HEMOTERAPIA

Em 1901, o físico austríaco Karl Landsteiner publicou seu trabalho sobre a descoberta de três tipos sanguíneos em humanos A, B e C. Mais tarde, mudou o C para O e, em 1902, o Dr. Landsteiner e colaboradores identificaram o quarto tipo sanguíneo, o AB, descoberto porque o plasma de seus portadores aglutinavam eritrócitos dos grupos A e B. Em 1907, em Nova York, ocorreu a primeira transfusão de sangue usando-se a correspondência cruzada entre doador e receptor, sob a supervisão do Dr. Reuben Ottenberg (RED GOLD, 2011).

De acordo com Hess (2006), em 1915, Rous e Turner desenvolvem uma solução de citrato e glicose, que permitiu armazenar o sangue por até trinta dias após a coleta.

Em 1917, Dr. Robertson, familiarizado com o trabalho dos doutores Rous e Turner, coleta e armazena sangue tipo O, em garrafas de vidro, com solução de citrato-glicose, que seria então utilizado durante a Primeira Guerra Mundial. Em 1922, surge o primeiro serviço de doadores de sangue, em Londres, onde voluntários que concordassem eram recrutados para doar sangue em caso de necessidade (RED GOLD, 2011; PURO SANGUE, 2011).

Landsteiner e Wiener, em 1940, injetaram hemácias de um grupo de macacos da espécie *Macaco rhesus* em coelhos e, com isso, obtiveram um anticorpo chamando anti-Rh e descobriram um novo sistema de grupos sanguíneos, ao qual deram o nome de Rh. Fisher & Race criaram uma nomenclatura para os antígenos Rh, na qual a presença de antígeno D definia o chamado Rh positivo; e a ausência do antígeno D, o Rh negativo. A partir desta época, as pesquisas têm evoluído e novos grupos sanguíneos têm sido descobertos e sua importância, pesquisada (DANIELS & BROMILOW, 2007).

Em meados de 1950, utiliza-se pela primeira vez bolsas de material plástico para armazenar sangue (HESS, 2006). Anteriormente a esta data, eram usadas apenas garrafas de vidro com esta finalidade e a introdução dos frascos plásticos

vieram a revolucionar o método de armazenagem do sangue colhido (RED GOLD, 2011; PURO SANGUE, 2011).

Com a adição de soluções anticoagulantes, componentes preservantes começaram a ser adicionados também ao sangue total. A primeira mistura que mostrou melhor resultado foi a de ácido cítrico, citrato de sódio e glicose (ACD) (HARMENING, 2006).

Em meados da década de 60, a solução ACD foi substituída por solução de citrato, fosfato e dextrose (CPD) a qual, por conter NaH_2PO_4 e não conter ácido cítrico, apresenta a vantagem de aumentar a capacidade tamponante e manter os eritrócitos em pH mais elevado em relação a ACD, preservando o sangue por até 21 dias, à temperatura de 1° a 6°C (GRIMES, 1980). Ainda neste período, as bolsas plásticas, que começavam a ser utilizadas em sistema fechado estéril, aumentaram a segurança das transfusões. Outro aspecto relacionado com a preservação dos componentes do sangue relativo às bolsas plásticas para coleta e preservação, é o fato de que, o material que as compõe permite a troca de gases, ao contrário dos frascos de vidro. Assim, estas bolsas conservam melhor as funções celulares, além de possibilitarem o processamento do sangue e o fracionamento do mesmo em seus componentes (SOARES, 2002).

A partir de, da década de 60 e, principalmente durante a guerra do Vietnam, as técnicas de processamento do sangue evoluíram muito, melhorando o aproveitamento do uso dos hemocomponentes (GUERRA, 2000).

No final da década de 60 a adição da adenina à solução de CPD, constituindo duas novas soluções preservantes, foram aprovadas para uso em banco de sangue: a chamada CPDA-1, que contém 25% a mais de glicose em relação a CPD, além da adenina; e a CPDA-2 que contém 100% de glicose a mais que a solução de CPD. Ambas as soluções são capazes de manter os eritrócitos por até 35 dias, refrigerados entre 1° e 6°C (HARMENING, 2006).

A primeira solução aditiva a ser utilizada foi o SAG, constituído de salina, adenina e glicose (HESS, 2006) que permitiu o limite de armazenamento dos eritrócitos ainda hoje aceito, de 42 dias, a temperatura de 1° a 6°C, com sobrevida pós-transfusional (SPT) de 80% dos eritrócitos 24 h após a transfusão. As soluções aditivas mais empregadas comercialmente são Adsol (AS-1) composto por adenina tamponada, glicose e manitol, Nutricel (AS-3) composto por adenina glicose tamponada e Optisol (AS-5) composto por adenina, glicose e manitol (HARMENING,

2006). A hemólise dos eritrócitos armazenados pode variar de doador para doador, sendo um dos fatores limitantes para armazenamento de bolsas de sangue por mais de 42 dias, porém a adição do manitol reduz a hemólise consideravelmente (HESS, 2006).

2.8 SISTEMAS DE GRUPOS SANGÜÍNEOS

Os grupos sangüíneos são definidos por antígenos espécie-específicos presentes na superfície dos eritrócitos. Estudos têm revelado que os antígenos de grupos sangüíneos estão expressos na membrana eritrocitária com ampla diversidade estrutural, incluindo epítomos de carboidratos em glicoproteínas e/ou glicolipídios e em proteínas inseridas na membrana, via domínios de multipassagem ou ligados a glicosilfosfatidinositol (Figura 4) (DANIELS & BROMILOW, 2007).

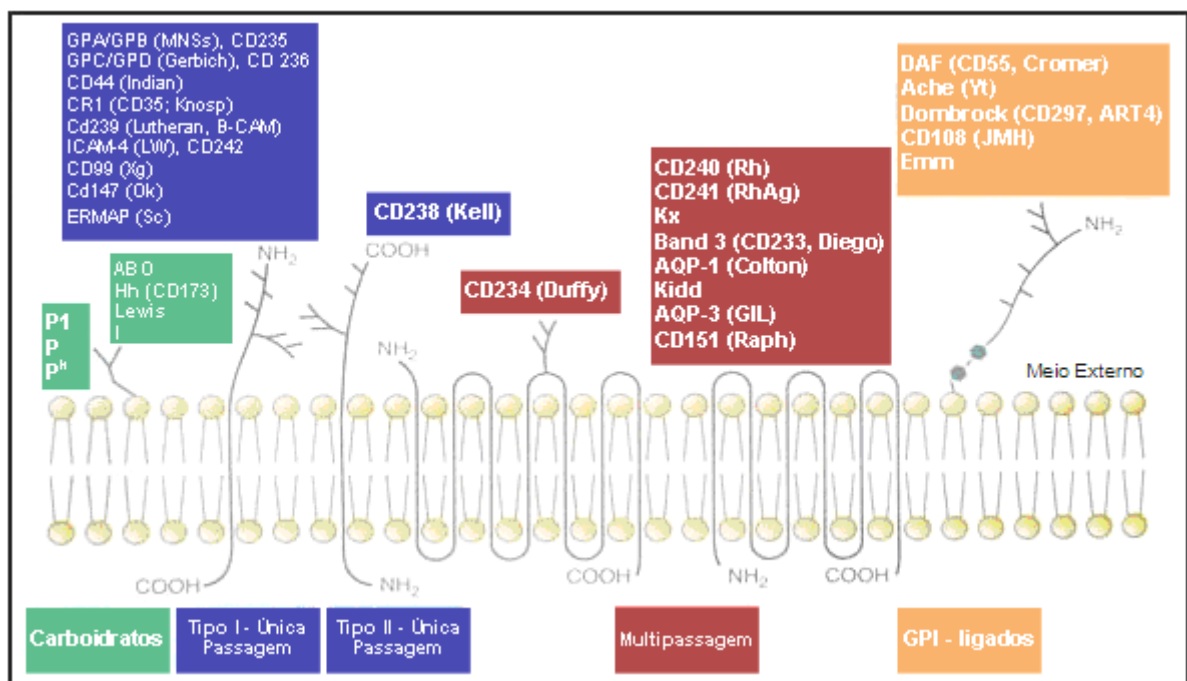


FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS LIGADOS A MEMBRANA PLASMÁTICA DO ERITRÓCITO.

FONTE: Adaptada de KAUSHANSKY *et al.*, (2011)

Entretanto, estes antígenos também podem estar presentes nas plaquetas, nos leucócitos, em células de outros tecidos e, algumas vezes, em fluídos do

organismo, como soro e saliva. Contudo, a especificidade sorológica, nestes casos, é determinada pela estrutura do carboidrato (DANIELS & BROMILOW, 2007; GREER *et al.*, 2009).

Os antígenos eritrocitários podem variar em imunogenicidade, significado clínico, detecção e descrição, podendo ser detectado através de testes sorológicos com anticorpos policlonais ou monoclonais. Os antígenos determinantes dos grupos sanguíneos, por serem marcadores genéticos, podem também ser utilizados como critério de exclusão em testes de paternidade. Além disso, mesmo que ainda não comprovado, podem estar envolvidos na anemia hemolítica imunomediada e servirem como marcadores de doenças (HARMENING, 2006). Os grupos sanguíneos, cujos anticorpos estão recorrentemente implicados em reações transfusionais, doenças hemolíticas do recém-nato, e portanto de maior significado clínico, segundo Greer *et al.*(2009), são representados na Tabela 1.

TABELA 1 - SISTEMAS SANGUÍNEOS DE MAIOR SIGNIFICÂNCIA CLÍNICA

Sistema Sanguíneo	Anticorpo	Frequência Relativa na Pesquisa de Anticorpos	Reação Transfusional Hemolítica	Doença Hemolítica do Recém-nato
ABO	Anti-A	Todo Grupo B e O	Sim	Sim
	Anti-B	Todo Grupo A e O	Sim	Sim
Rhesus	Anti-D	Comum	Sim	Sim
	Anti-c	Comum	Sim	Sim
	Anti-E	Comum	Sim	Sim
	Anti-C	Comum	Sim	Sim
	Anti-e	Incomum	Sim	Sim
Kell	Anti-K	Comum	Sim	Sim
	Anti-k	Raro	Sim	Sim
Kidd	Anti-Jka	Comum	Sim	Sim
	Anti-Jkb	Raro	Sim	Sim
Duffy	Anti-Fya	Comum	Sim	Sim
	Anti-Fyb	Raro	Sim	Sim
MNS	Anti-M	Comum	Raro	Raro
	Anti-N	Raro	Raro	Raro
	Anti-S	Incomum	Sim	Sim
	Anti-s	Raro	Sim	Sim
Lewis	Anti-Lea	Comum	Sim	Não
	Anti-Leb	Incomum	Não	Não
P	Anti-P1	Comum	Raro	Não

FONTE: Adaptada de GREER *et al.* (2009)

Segundo a Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea, mais de 250 antígenos presentes na membrana do eritrócito são reconhecidos e foram organizados em 29 sistemas de grupos sanguíneos. O avanço dos estudos moleculares tem contribuído para desvendar aspectos sobre a funcionalidade e a importância da expressão dos antígenos presentes na membrana eritrocitária, sendo que os mesmos podem ser produzidos durante a formação das células e que, se presentes no plasma, podem ser adsorvidos à membrana (GREER *et al.*, 2009).

Os antígenos eritrocitários podem ainda ser esquematicamente divididos em: estruturais, transportadores, receptores e moléculas de adesão, enzimas, proteínas regulatórias do complemento, entre outros, de acordo com sua função (Figura 5) (BONIFÁCIO & NOVARETTI, 2009; GREER *et al.*, 2009).

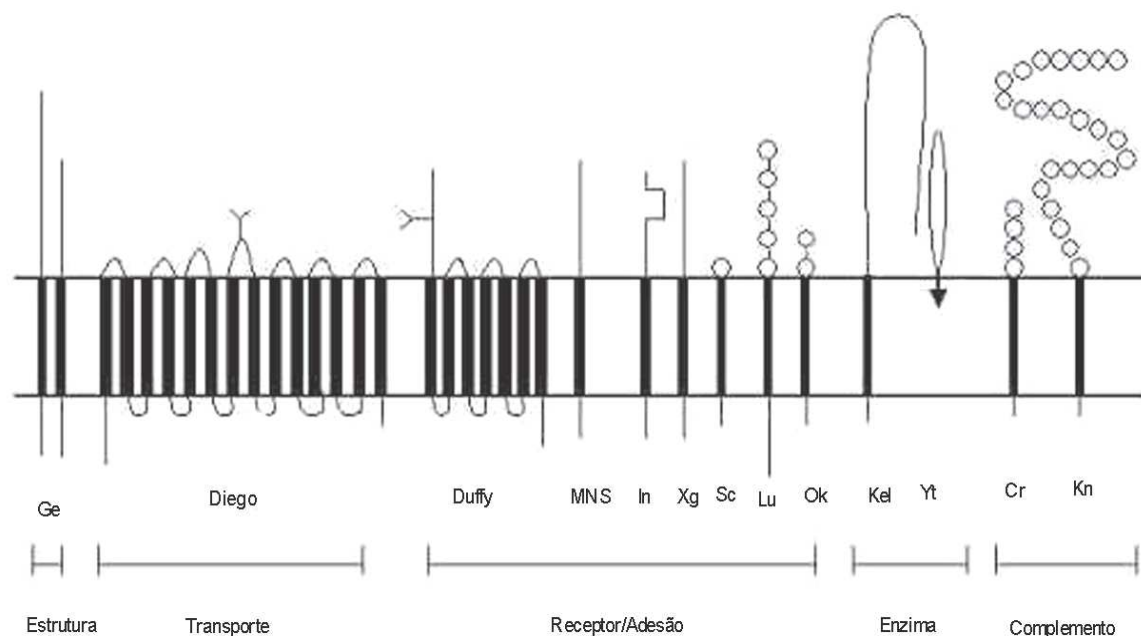


FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE ANTÍGENOS DE GRUPOS SANGÜÍNEOS CONFORME SUAS FUNÇÕES
 FONTE: BONIFÁCIO & NOVARETTI (2009)

Descoberto pelo cientista Karl Landsteiner em 1901, o Sistema ABO foi o primeiro dos grupos sanguíneos elucidado. Através de reações antígeno-anticorpo com hemácias de alguns indivíduos e plasma de outros, verificou-se a presença de aglutinação dos glóbulos em alguns casos, bem como sua ausência em outros (RED GOLD, 2011). Embora possua quatro fenótipos conhecidos: A, B, AB e O, mais de 200 alelos foram identificados por análise de DNA (KAUSHANSKY *et al.*, 2010).

Os genes A, B e O são alelos, isto é, qualquer um dos três pode ocupar o loco ABO em cada elemento do par de cromossomos responsáveis por este

sistema. O gene H, responsável pela produção do antígeno H, bem como seu alelo *h*, contribuem para a expressão dos genes A e B. O antígeno H é encontrado em concentração máxima em indivíduos do grupo O. O gene H é muito comum e a maioria dos indivíduos é homozigótico HH, seu alelo *h* é raro, e pessoas com genótipo *hh* possuem o fenótipo Bombay, no qual os genes A, B ou O herdados não podem se manifestar normalmente devido à ausência do antígeno H (HARMENIG, 2006; DANIELS & BROMILOW, 2007).

A hereditariedade de H é independente da hereditariedade do ABO, mas os antígenos A, B e H são todos formados a partir da mesma substância básica, que é um arcabouço protéico ou lipídico ao qual se fixam açúcares, criando um novo antígeno de acordo com o tipo de açúcar e a posição na qual é fixado, determinando a especificidade do antígeno (Figura 6) (GREER *et al.*, 2009).

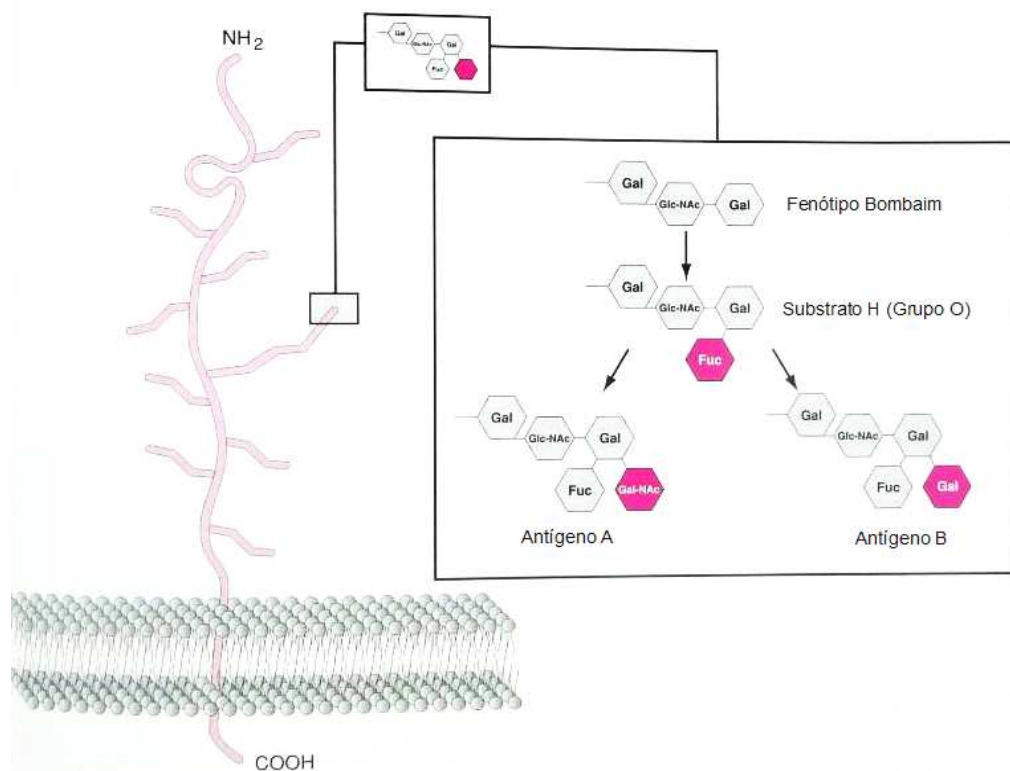


FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA FORMAÇÃO DOS ANTÍGENOS A e B

NOTA: Gal – D-galactose; Glc-Nac – N-acetilglucosamina; Fuc – L-fucose; Gal-Nac – N-acetilgalactosamina

FONTE: Adaptada de GREER *et al.* (2009)

Cada um dos genes, H, A ou B, controlam a fixação de um açúcar diferente. Sob a ação de um gene H, há a codificação de uma enzima fucosiltransferase que

adiciona um açúcar L-fucose ao açúcar terminal de uma cadeia precursora das hemácias, a molécula resultante é reconhecida como o antígeno H, capaz de estimular a produção e reagir com o anticorpo anti-H. O gene O não acrescenta nada à molécula básica, de modo que os glóbulos de uma pessoa do grupo O reagem fortemente com anti-H (DANIELS & BROMILOW, 2007).

A presença de um gene A codifica outra enzima, a N-acetilgalactosaminiltransferase, que adiciona um açúcar N-acetilgalactosamina ao antígeno H, formando o antígeno A, mas esta fixação dificulta a acessibilidade à L-fucose, uma vez que o anti-H não reage tão bem com células do grupo A como com células do grupo O. Já para a formação do antígeno B, sob a ação do gene B, há codificação de outra enzima, a D-galactosiltransferase, que adiciona o açúcar D-galactose ao antígeno H, convertendo-o no antígeno B. Esta interação interfere menos que a N-acetilgalactosamina na interação da substância H ao anti-H. Assim, a distinção que o anti-H faz entre células dos vários grupos ABO é, aparentemente, devida à diferença de acessibilidade à L-fucose, responsável pela especificidade H (DANIELS & BROMILOW, 2007; GREER *et al.*, 2009; KAUSHANSKY *et al.*, 2010).

A conversão do antígeno H em antígeno A ou B não é idêntica em todos os indivíduos, em especial no aspecto quantitativo, sendo que as enzimas transferases também não estão completamente desenvolvidas ao nascimento e, inicialmente, só tem atuação sobre cadeias precursoras não-ramificadas, de composição bioquímica mais simples. Desta forma, os recém-nascidos apresentam menor quantidade de antígenos A ou B nas hemácias e, por conseguinte, maior concentração do antígeno H do que quando adultos. Observa-se também maior conversão do antígeno H para A do que de H para B. O mesmo ocorre em relação aos subgrupos de A, sendo que o subgrupo A₁ é mais ativo que o A₂ (HARMENING, 2006; DANIELS & BROMILOW, 2007).

Entre os vários subgrupos do antígeno A, os mais importantes são A₁ e A₂. Embora o açúcar imunodominante seja o mesmo N-acetilgalactosamina, é possível que ocorram diferenças quantitativas em nível das transferases. A diferenciação do subgrupo A₁ pode ser feita mediante reação positiva com lectina anti-A₁ (HARMENING, 2006).

No caso do grupo B, embora não haja diferenciação de antígenos B₁ e B₂, raramente podem ocorrer subgrupos de B. Não existem lectinas específicas para a sua diferenciação (HARMENING, 2006).

Os indivíduos que apresentam os antígenos A e B na superfície dos seus eritrócitos são classificados como do grupo AB (HARMENING, 2006).

Os antígenos solúveis A, B e H presentes na saliva são substâncias solúveis com a mesma especificidade que aqueles encontrados nos glóbulos vermelhos. Os genes ABO e H são responsáveis pela produção de todos os antígenos ABH, mas o aparecimento dos antígenos na saliva é regulado por outro grupo de genes, os genes Se e seu alelo se, sendo que o gene Se ocorre em 80% dos indivíduos. A presença deste gene interfere também na formação dos antígenos Lewis. Pessoas com genótipo SeSe e Sese secretam substâncias grupo específicas na saliva, enquanto os indivíduos genótipo sese são chamados não secretores, e não apresentam as substâncias A, B e H na saliva. Porém, a secreção desses antígenos em outros fluídos corporais como plasma, suco gástrico e bile não depende do gene Se. Os genes Sese são herdados independentemente dos grupos ABO e H. As substâncias grupo específicas normalmente encontradas na saliva dos secretores são os antígenos: grupo A, A e H; grupo B, B e H; grupo O, H; e grupo AB, A, B e H (HARMENING, 2006; GREER *et al.*, 2009).

Os testes de pesquisa de substâncias ABH na saliva podem ajudar a estabelecer o genótipo de um indivíduo cujos antígenos nos glóbulos vermelhos se encontram pouco desenvolvidos ou ausentes. Por exemplo, a demonstração de substâncias A e H na saliva prova que houve herança de um gene A, um gene H e um gene Se (HARMENING, 2006)

Os glóbulos vermelhos de uma pessoa de fenótipo Bombay não possuem gene H, ou seja, são indivíduos *hh* e são, portanto, destituídos dos antígenos do sistema ABO, sendo que, em testes de rotina, suas células não são aglutinadas por anti-A, anti-B ou anti-H. Entretanto, células do grupo O reagem fortemente com anti-H, ao passo que células Bombaim não reagem com anti-H. Indivíduos com genótipo *hh* não secretam antígenos A, B ou H na saliva, pois para que os antígenos ABH ocorram na saliva, tanto o gene H como Se devem estar presentes (GREER *et al.*, 2009).

A compatibilidade ou incompatibilidade de grupos importantes como os sistemas ABO e Rh entre doador e receptor é uma consideração fundamental para uma transfusão de sangue bem sucedida (HARMENING, 2006).

O sistema Rh é o segundo sistema eritrocitário em importância clínica e o primeiro em complexidade, muito mais do que a simples tipificação em Rh Positivo e

Rh Negativo, possui 50 antígenos catalogados, que são de natureza glicoprotéica com importante papel na integridade da membrana eritrocitária. (KAUSHANSKY *et al.*, 2010).

A expressão dos antígenos do sistema Rh na superfície do eritrócito depende da presença da glicoproteína Rh-associada (RhAG), produto do gene RHAG, são proteínas integrais, e sua ausência é demonstrada pela síndrome *RH null*, que cursa com diversas anormalidades eritrocitárias e anemia hemolítica (Figura 7) (LORENZI, 2006b).

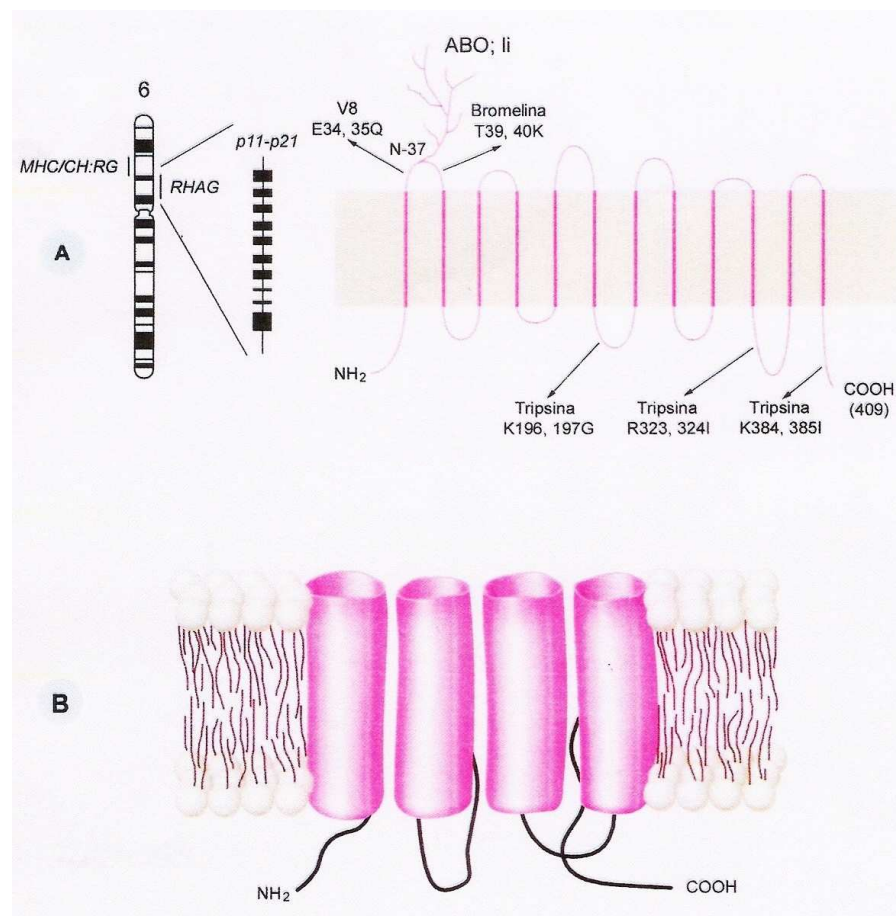


FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PROTEÍNA Rh
FONTE: LORENZI (2006b)

A expressão dos antígenos do Sistema Rh é codificada a partir de dois genes: o RHD que codifica o antígeno D em indivíduos Rh positivo, e na sua ausência, não haverá a codificação do antígeno, em indivíduos Rh negativo. O antitético a D não existe, entretanto por convenção utiliza-se *d* para conotar a ausência do antígeno D. O outro gene que compõe o sistema é o RHCE, que

codificará os antígenos *C* ou *c* juntamente com *E* ou *e* (Figura 8) (KAUSHANSKY *et al.*, 2010).

O comportamento desses antígenos é de co-dominância, ou seja, os produtos de ambos os genes se manifestam nas hemácias. Também ocorrem variações no sistema Rh, sendo que alguns genes podem levar a alterações na quantidade de produção dos antígenos como: supressão, potencialização ou influência sobre a expressão de outros produtos gênicos (DANIELS & BROMILOW, 2007).

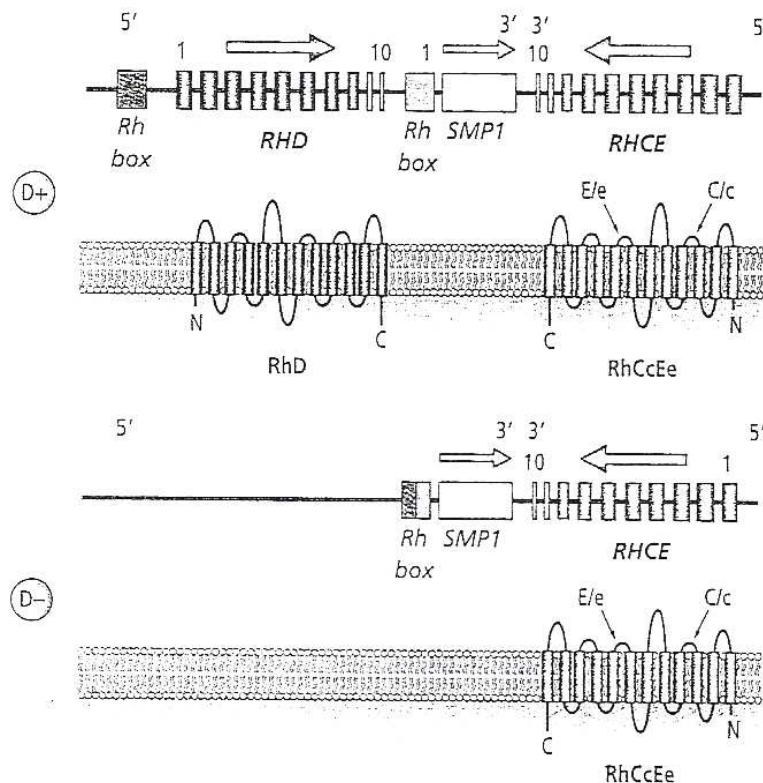


FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS GENES RHD e RHCE
 NOTA: Pode-se observar na parte superior da figura Rh positivo e na inferior Rh negativo
 FONTE: DANIELS & BROMILOW (2007)

Três modelos podem ser usadas para nominar o sistema de Rh. A nomenclatura de Fisher-Race usa a terminologia CDE com seus pares de alelos *cde*, sendo que o alelo *d* não existe, a representação é utilizada para denominar sua ausência. O grupo dos alelos do complexo gênico é denominado haplótipo. A combinação destes genes formaria oito combinações haplotípicas diferentes: Dce, DCe, DcE, dce, dCe, dcE, dCE. (FATOR Rh, 2011).

A nomenclatura de Wiener utiliza: Rh e rh , com capacidade de produção e ausência de codificação para o Rh_0 (D) respectivamente, se agregam sub-índices e supra-índices para identificar os diferentes haplótipos: Rh_0 , rh' , rh'' , hr' e hr'' , formando oito combinações gênicas: R^0 , R^1 , R^2 , R^z , r , r' , r'' , e r^y , correspondentes às da nomenclatura de Fisher e Rice respectivamente (Tabela 2) (DANIELS & BROMILOW, 2007).

Rosenfield e Rubinstein, por outro lado, fazem uso das designações numéricas para os antígenos de sistema Rh, onde D = 1, C = 2, E = 3, c = 4, e = 5, sendo que a ausência do antígeno é representada por um sinal negativo antes do número (GARGIULO, 2011).

TABELA 2 - TERMINOLOGIAS UTILIZADAS PARA NOMINAR OS ANTÍGENOS DO SISTEMA Rh

DENOMINAÇÃO DOS ANTÍGENOS Rh		
Fisher-Race	Wiener	Rosenfield
D	Rho	RH 1
C	rh'	RH 2
E	rh''	RH 3
d	hr_0	--
c	hr'	RH 4
e	hr''	RH 5

FONTE: Adaptada de GARGIULO (2011)

Independente da nomenclatura utilizada, os antígenos estão estritamente relacionados e formam complexos gênicos ou haplótipos expressando-se na membrana da hemácia (Tabela 3).

O soro de pessoas Rh negativas não contém anti-D naturalmente. Quando tais anticorpos são encontrados no soro, significa que este indivíduo foi previamente exposto a eritrócitos Rh positivos, ou seja, foi imunizado (BONIFÁCIO & NOVARETTI, 2009; GREER *et al.*, 2009).

O antígeno D apresenta variações qualitativas e quantitativas, como o fenótipo D fraco, que é a expressão diminuída do antígeno D. O aparecimento deste fenótipo pode se dar pela transmissão genética, onde um indivíduo herda um gene que codifica uma expressão diminuída do D, que apresenta um baixo grau de reatividade contra os soros anti-D. Atualmente, no entanto, com o uso de soros mais

potentes, várias células que seriam consideradas D fraco, acabam sendo classificadas como Rh positivo. Este fenótipo também é observado quando o D está acompanhado do haplótipo Cde em posição trans, sendo que a expressão do antígeno D é deprimida pela presença de C em trans. Neste caso, o fenótipo é conhecido como D fraco de alto grau de reatividade, pois pode apresentar reatividade normal com vários soros anti-D (DANIELS & BROMILOW, 2007).

TABELA 3 - HAPLÓTIPOS BASEADOS NA PRESENÇA DOS ANTÍGENOS DO SISTEMA Rh

COMPLEXOS GÊNICOS DOS SISTEMA Rh		
Fisher-Race	Wiener	Rosenfield
DCe	R ¹	RH 1,2,-3,-4,5
dce	R	RH -1,-2,-3,4,5
DcE	R ⁴	RH 1,-2,3,4,-5
Dce	R ⁰	RH 1,-2,-3,4,5
dcE	r ^{''}	RH -1,-2,3,4,-5
dCe	r [']	RH -1,2,-3,-4,-5
DCE	R ^z	RH 1,2,3,-4,-5
dCE	R ^y	RH -1,2,3,-4,-5

FONTE: Adaptada de GARGIULO (2011)

Os antígenos do sistema Lewis são pouco expressos ao nascimento e não são sintetizados pelos eritrócitos, mas sim pelas células teciduais, sendo secretados nos fluidos orgânicos e no plasma e posteriormente adsorvidos na membrana dos eritrócitos. Os antígenos do sistema Lewis presentes nas secreções são glicoproteínas, enquanto os antígenos presentes no plasma e os adsorvidos pelos eritrócitos são glicolipídios. A herança do gene *Le* atua em competição com os genes ABO, sendo que o gene *Le* codifica a enzima L-fucosiltransferase, que adiciona a L-fucose ao carbono 4 da N-acetilglucosamina da estrutura precursora do tipo 1, formando assim o antígeno *Le^a*, fenótipo *Le (a+b-)*. Enquanto isso, para a expressão da substância *Le^b*, são necessários os genes *Le* e *Se*. Na presença do gene *H* e do gene *Se*, uma segunda L-fucose é adicionada ao carbono 4 da N-acetil-D-glucosamina do tipo H1, formando assim o antígeno *Le^b*, fenótipo *Le (a-b+)* (Figura 9). Os indivíduos portadores do alelo *le* em homozigose, *lele*, não formam o

antígeno Le^a e são fenótipo Le (a-b-). Os anticorpos Lewis são geralmente IgM e podem ligar-se ao complemento (DANIELS & BROMILOW, 2007; BONIFÁCIO & NOVARETTI, 2009).

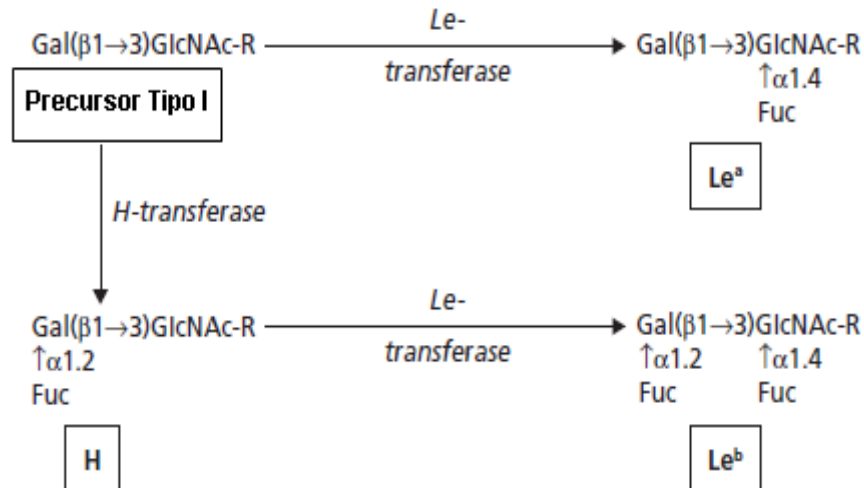


FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS ANTÍGENOS Le^a e Le^b E SEUS PRECURSORES

NOTA: Gal – D-galactose; Glc-Nac – N-acetilglucosamina; Fuc – L-fucose.

FONTE: Adaptada de KLEIN & ANSTEE (2005)

O Sistema P, por definição genética, é resultado de pelo menos dois *loci* responsáveis pela síntese de seus antígenos. A partir de um precursor comum, lactosilceramídeo, sob a ação do gene P^k, ocorre a conversão do precursor para o antígeno P^k. O seu alelo P^{k1} tem a capacidade de converter tanto antígeno P^k como outra estrutura paraglobosídeo no antígeno P₁. Sob a ação de um outro gene P, há a conversão do antígeno P^k em P. O seu raro alelo P⁰ não promove essa conversão. Dessa forma, há a presença de cinco fenótipos distintos: P₁, P₂, P^k, P^{k1} e o raro fenótipo *p*. A expressão do antígeno P₁ é variável e o mesmo está pouco desenvolvido ao nascimento. O anticorpo anti-P₁ é comum, da classe IgM, habitualmente uma crioaglutinina de reação salina fraca, raramente detectada em testes de rotina (HARMENING, 2006; BONIFÁCIO & NOVARETTI, 2009).

No sistema Lutheran, os antígenos produzidos a partir dos genes co-dominantes alélicos estão pouco desenvolvidos ao nascimento, e representados

pelos antígenos Lu^a e Lu^b. Os anticorpos formados são o anti-Lu^a, aglutinina que ocorre naturalmente com reação salina à temperatura ambiente; e o anti-Lu^b, anticorpo da classe IgG, reativo na fase da anti-globulina humana (BONIFÁCIO & NOVARETTI, 2009).

O Sistema sanguíneo MNSs é o segundo mais complexo, contendo 40 antígenos associados, todavia somente cinco deles são relevantes. Há duas glicoproteínas na membrana eritrocitária definindo os antígenos M e N (glicoforina A) e os antígenos Ss (glicoforina B). A genética do sistema MNS é muito complexa, sendo que MN e Ss são pseudo-alelos que se combinam entre si, formando quatro haplótipos (MS, Ms, NS e Ns). Os genes M e N são antitéticos, ou seja, um indivíduo pode apresentar M ou N ou ambos. O mesmo fenômeno ocorre com os genes S e s. A presença dos antígenos leva à formação de anticorpos anti-M e Anti-N, crioaglutininas de reação salina, que não ligam complemento e nem reagem com células enzimaticamente tratadas. O anti-N foi detectado em pacientes renais submetidos a tratamento por diálise. O anticorpos anti-S e anti-s são da classe IgG, reativos a 37° C na fase de antiglobulina; podem ligar complemento e têm sido associados à doença hemolítica do recém-nascido e a reações hemolíticas transfusionais (DANIELS & BROMILOW, 2007; BONIFÁCIO & NOVARETTI, 2009; GREER *et al.*, 2009).

No grupo sanguíneo Kell, os antígenos são detectados apenas em eritrócitos, estão bem desenvolvidos ao nascimento e não são destruídos por enzimas. Em relação à imunogenicidade, o antígeno Kell (K) fica atrás apenas do D. O anti-K é habitualmente da classe IgG, produzido em resposta à gravidez ou à transfusão de eritrócitos; tem sido associado à doença granulomatosa crônica ligada ao cromossoma X (HARMENING, 2006; BONIFÁCIO & NOVARETTI, 2009).

O antígenos Fy^a e Fy^b pertencem ao sistema de grupos sanguíneos Duffy, são glicoproteínas e sua estrutura atravessa a membrana sete vezes (Figura 10) (DANIELS & BROMILOW, 2007). Podem ser destruídos por enzimas, habitualmente estão bem desenvolvidos ao nascimento. Foi demonstrado que eritrócitos Fy(a- b-) resistem à infecção por *P.knowlesi* e *P.vivax*, causadores da malária. Os anticorpos anti-Fy^a e anti-Fy^b pertencem à classe IgG, reagem na fase da antiglobulina, e podem ser implicados em reações hemolíticas transfusionais tardias (BONIFÁCIO & NOVARETTI, 2009).

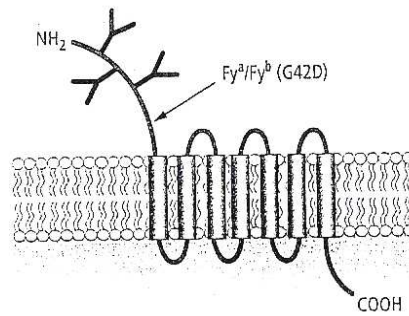


FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS ANTÍGENOS Fy^a e Fy^b
 FONTE: DANIELS & BROMILOW (2007)

No sistema de grupos sanguíneos Kidd, os antígenos estão bem desenvolvidos ao nascimento, com potencial de ocorrência de doença hemolítica do recém-nascido. São glicoproteínas cuja estrutura atravessa a membrana dez vezes (Figura 11). Os anticorpos anti- Jk^a e anti- Jk^b podem demonstrar efeito de dose, frequentemente são fracos e detectados em combinação com outros anticorpos; ambos são da classe IgG e reativos com antiglobulina, não ligam complemento e são produzidos em resposta à exposição a eritrócitos estranhos durante a gravidez, sendo causa comum de reações hemolíticas transfusionais tardias. (DANIELS & BROMILOW, 2007; BONIFÁCIO & NOVARETTI, 2009).

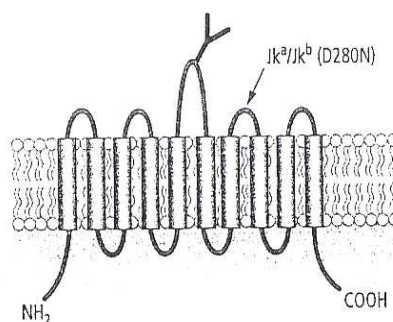


FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS ANTÍGENOS Jk^a e Jk^b
 FONTE: DANIELS & BROMILOW (2007)

O sistema Diego (Figura 12), foi descoberto em 1955 (*Diego a*), mais tarde (1967), em circunstâncias semelhantes descreveu-se o segundo antígeno (*Diego b*). Em 1992 os antígenos Wright foram reclassificados e como sendo parte do sistema Diego, porém a nomenclatura dos fatores não mudou, com os fatores de ex-Wright ainda assinado "Wr" enquanto o resto dos elementos é nominado Diego 'Di', sendo hoje o sistema composto por 21 antígenos. São glicoproteínas de baixa incidência,

localizadas na proteína Banda 3 e seus principais representantes são o Di^a e Di^b sendo que os genótipos possíveis são: $\text{Di} (a-b+)$, $\text{Di} (a+b+)$ e $\text{Di} (a+b-)$. (SILVA *et al.*, 2004; DANIELS & BROMILOW, 2007).

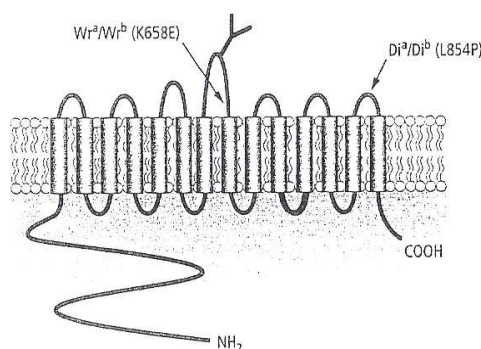


FIGURA 12 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS ANTÍGENOS Di^a e Di^b / Wr^a e Wr^b
 FONTE: DANIELS & BROMILOW (2007)

2.9 RETICULÓCITO

Os reticulócitos (Figura 13), precursores dos eritrócitos maduros, são assim chamados devido à presença do “retículo”, composto por grânulos de ribossomos contendo restos de RNA ribossomal, distribuído em bandas ou compactados de maneira densa na célula anucleada, conferindo-lhes volume aproximadamente 20% maior que os eritrócitos maduros, além de forma e superfície irregular, devido ao excesso de membrana citoplasmática. Os reticulócitos são ricos em hemoglobina e apresentam, ainda, mitocôndrias e vacúolos autofágicos, sendo que, cessam a síntese de hemoglobina ao se transformarem em eritrócitos maduros (GREER, *et al.*, 2009; KAUSHANSKY, *et al.*, 2010).

Segundo Lewis *et al.* (2006) a maturação dos reticulócitos em um processo normal, ocorre em 2 a 3 dias, sendo o último deles na circulação, com desagregação progressiva dos ribossomos e mitocôndrias. Para Kaushansky, *et al.* (2010), ele permanece na circulação periférica entre 24 a 48 h. Em um processo de estímulo medular sob estresse, os reticulócitos são expulsos precocemente da medula óssea e sua maturação pode levar até 3 dias, no chamado *stress reticulocytes* (RILEY *et al.*, 2002; LEWIS *et al.*, 2006). Os reticulócitos representam de 1,0 a 1,5 % do total das hemácias e correspondem às células recém-lançadas na circulação (LORENZI,

2006a). Greer *et al.* (2009) aponta como valores normais de 0,5 a 1,5% e Lewis *et al.* (2006) 0,5 e 2,5 %, com valores absolutos, entre 50 e 100x10⁹/l, para adultos e crianças. Porém, empregando-se os sistemas automatizados, estes valores variam de acordo com os princípios dos equipamentos utilizados, tendo sido encontrados trabalhos com variações entre 0,2 e 3,0 % e, para valores absolutos entre 10 e 140x10⁹/l.

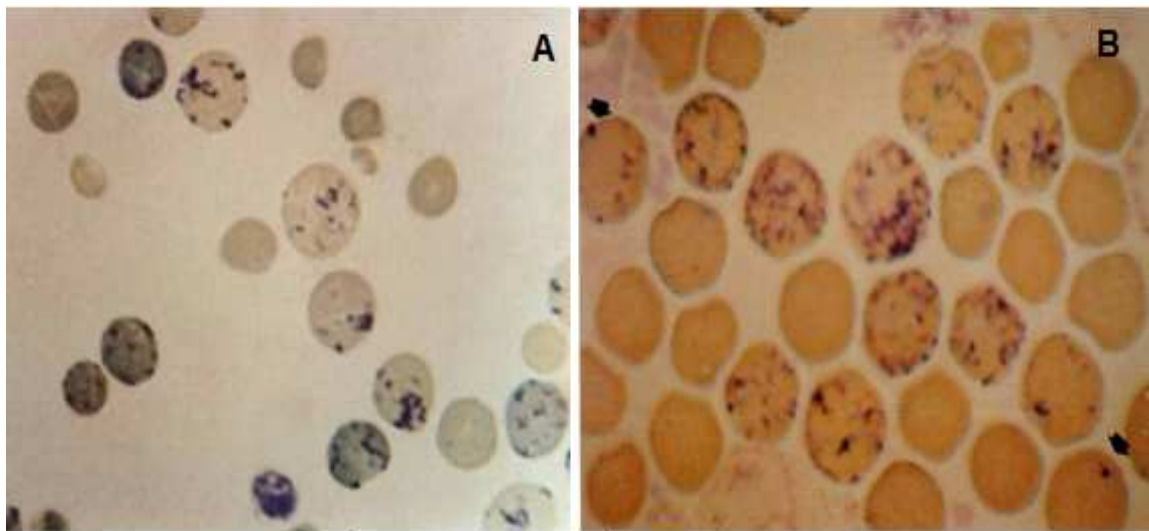


FIGURA 13 - ASPECTO MORFOLÓGICO DE RETICULÓCITOS

NOTA: A – Sangue periférico colorado pelo azul de crezil brilhante a 1% e disposto em esfregaço; B – Sangue periférico colorado pelo azul de crezil brilhante a 1% e disposto em esfregaço "contra-corado" com Giemsa-May Grunwald

FONTE: DOENÇAS DOS ERITRÓCITOS: Os Reticulócitos (2011) Disponível em: <http://www.ciencianews.com.br/doencaeritro/Reticul%F3cit%20-%205/reticulo.htm>. Consultado em 05/10/2011

Embora lentamente, os reticulócitos sintetizam hemoglobina e algumas proteínas, como as enzimas metabólicas, além de pentoses-fosfato, e são capazes de liberar energia por via aeróbica mitocondrial através da degradação do piruvato a CO₂ e água (WICKRAMASINGHE *et al.*, 1986).

A contagem dos reticulócitos é utilizada para estudar a eritropoiese e, por ser capaz de avaliar a regeneração medular, serve como indicador precoce da recuperação medular, auxiliando no diagnóstico e na monitoração de doenças hematológicas. Assim, pode se constituir em uma medida útil do estresse proliferativo na medula óssea eritróide (NORONHA & GROTO, 2002; FERNANDÉZ *et al.*, 2007).

O aumento da produção de reticulócitos frente a um estímulo indica resposta da medula óssea, dado esse importante e que deve ser avaliado nas respostas terapêuticas. Geralmente, resultados elevados são vistos após perda de sangue aguda ou aumento da destruição dos eritrócitos, podendo apresentar-se normais ou aumentados de 3 a 6 vezes após terapia com ferro para anemia ferropriva ou com folato ou vitamina B₁₂ para anemias megaloblásticas, em policitemias, em carcinoma metastático na medula óssea, entre outros. Valores muito aumentados, podem ser encontrados em casos de anemia falciforme (WALLACH, 1999).

Contagens de reticulócitos diminuídas indicam eritropoiese ineficiente e podem ser encontradas em casos de anemias aplásicas, crises não regenerativas, alterações megaloblásticas e alcoolismo (WALLACH, 1999). As contagens podem ser normais ou diminuídas em casos de anemia de doença crônica, doenças mielo e linfoproliferativas, entre outros (SIMMONS, 1997; WALLACH, 1999).

A contagem de reticulócitos pode ser utilizada também para acompanhamento e monitoração de pacientes com câncer em tratamento (CANÇADO, 2007).

Podem ser empregadas duas metodologias para a contagem de reticulócitos em laboratório clínico, a manual e a automatizada, de acordo com o protocolo de normas técnicas H44-A do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) e as recomendações do *International Committee for Standards in Haematology* (ICSH).

A contagem de reticulócitos pela técnica manual fundamenta-se na propriedade dos corantes supra-vitais de precipitarem restos de RNA ribossomal. Na metodologia empregada, coloca-se volumes determinados de corante supra vital e sangue periférico, incuba-se a 37° C por tempo determinado e preparam-se extensões em lâminas, observando-se os reticulócitos ao microscópio (RILEY *et al.*, 2002).

O *College of American Pathologists* (CAP) padronizou, em 1986, a definição de reticulócito: célula vermelha anucleada contendo no mínimo duas partículas de material corado, correspondendo à precipitação de ácidos nucleicos, após coloração supravital, tanto para técnica manual como para a eletrônica (PIERRE, 2002; NASCIMENTO, 2004).

Durante a incubação, o corante precipita filamentos de RNA que se coram, e são contados ao microscópio óptico em aumento de 1000x. Para se obter uma boa

técnica, é essencial que os reticulócitos estejam bem corados, as extensões tenham sido preparadas com boa técnica para que o observador não encontre campos espessos ou finos demais para contar o número suficiente de células. Deve-se optar por uma área da extensão onde os eritrócitos estejam íntegros, sem sobreposição e com boa coloração, sendo indispensável que as suspensões tenham sido bem homogeneizadas para garantir uma distribuição homogênea das células. A técnica ideal de observação microscópica para se obter um grau aceitável de reprodutibilidade, ocorre quando os reticulócitos forem contados em uma maior quantidade de campos, consecutivos e não ao acaso. Desta forma, o método torna-se mais preciso na medida em que aumenta o número de células contadas, principalmente quando o número de reticulócitos é baixo, sendo necessário examinar campos, até contar ao menos 100 reticulócitos e contar eritrócitos em, ao menos 10 campos, para ter uma média de número por campo, a fim de diminuir o erro padrão, que deve ser inferior a 10 %. Quando o número de reticulócitos é maior, o número de campos a ser contado pode ser menor (Tabela 4) (LEWIS *et al.*, 2006).

Pode-se empregar o disco de Miller calibrado (Figura 14), adaptado na ocular na forma de dois quadrados, um dentro do outro, sendo que o menor ocupa aproximadamente um nono da área do quadrado maior, sendo que, neste são contados os reticulócitos e, naquele, os eritrócitos. A contagem relativa de reticulócitos é obtida através da razão entre o número total de reticulócitos e o número total de eritrócitos, multiplicada por 100. Se for utilizado o disco de Miller, o número de eritrócitos deverá ser multiplicado por 9 (RILEY *et al.*, 2002; PIERRE, 2002; LEWIS *et al.*, 2006).

No método manual para determinação do número de reticulócitos com o uso de fluorescência, mistura-se laranja de acridina (50 mg/dl em NaCl 9 g/l) ao sangue, homogeneizando-se por 2 min, faz-se extensões em lâmina e observa-se a fluorescência do RNA em vermelho-laranja. Porém, esta técnica não é considerada adequada visto que, além de exigir o uso de microscópio de fluorescência, o brilho e a cor do retículo são instáveis (LEWIS *et al.*, 2006).

O princípio da metodologia utilizada pelos contadores eletrônicos de células é o da citometria de fluxo. As células passam por uma corrente fluída estreita entre uma fonte de luz - feixe de laser, de uma única frequência e fotodetectores, os quais medem suas características (Figura 15). Essa medida está fundamentada no espalhamento, absorção ou emissão da luz pelas células, que a espalham ou a

emitem em diferentes ângulos e intensidades, gerando informações sobre seu próprio tamanho, estrutura interna, granularidade e morfologia superficial (LEWIS, *et al.*, 2006; GREER *et al.*, 2009).

TABELA 4 - CONTAGEM MANUAL DE RETICULÓCITOS: INFLUÊNCIA DA PORCENTAGEM DE ERRO E NÚMERO DE ERITRÓCITOS NA EXATIDÃO DAS CONTAGENS

Grau de Exatidão desejado Erro (%)	RETICULÓCITOS (%)					
	1	2	5	10	25	50
20%	2.525	1.225	475	225	100	25
10%	10.100	4.900	1.900	900	400	100
5%	40.400	19.600	7.600	3.000	1.600	400

NOTA: Os dados referem-se ao número de células a serem contadas.

FONTE: DACIE & LEWIS (1965)

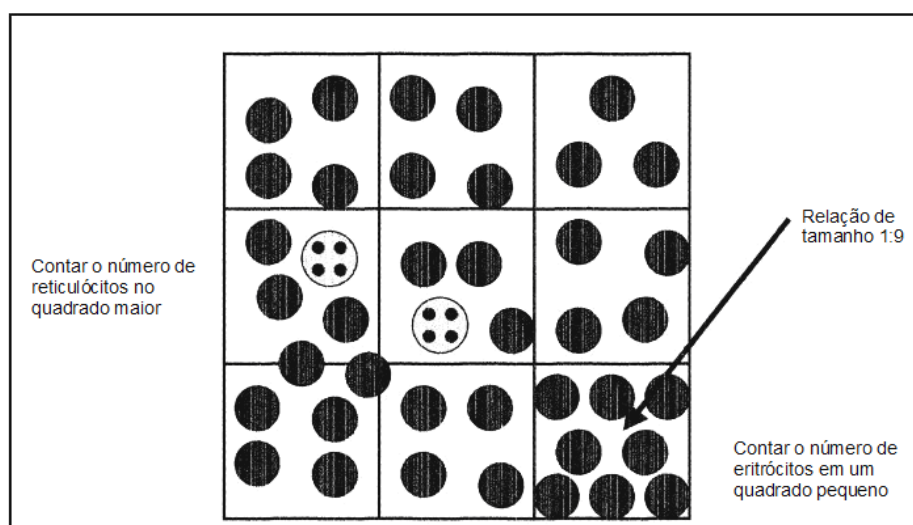


FIGURA 14 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO DISCO DE MILLER PARA CONTAGEM DE RETICULÓCITOS AO MICROSCÓPIO ÓTICO
FONTE: Adaptada de PIERRE (2002)

De acordo com BRUGNARA *et al.*, (1997), os equipamentos que combinam citometria de fluxo e reativos fluorescentes melhoram a possibilidade de uma maior precisão nos resultados dos índices de produção dos eritrócitos, por utilizar critérios de reconhecimento padrão, assegurando a avaliação do grau de maturação da população de reticulócitos.

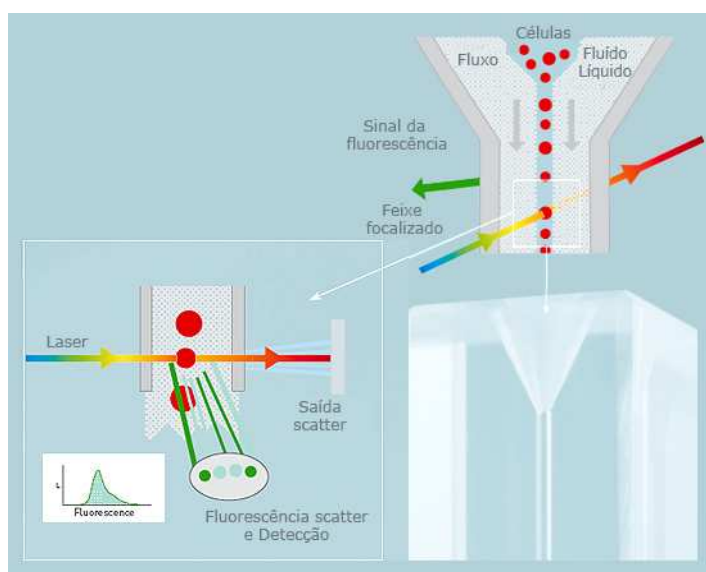


FIGURA 15 - REPRESENTAÇÃO DO SISTEMA DE LEITURA DE CÉLULAS EM EQUIPAMENTOS ELETRÔNICOS

FONTE: Relma Comercial (2011) Disponível em: <http://www.relma.com.br/hellma/citometria.html>

Para a contagem dos reticulócitos na metodologia automatizada, o RNA ribossomal dos reticulócitos é evidenciado através de coloração supra-vital ou da formação de complexos enzimáticos que se ligam a um marcador fluorescente (Figuras: 16 e 17) (STIENE-MARTIN *et al.*, 1998; RILEY *et al.*, 2001). Os equipamentos automatizados para determinação de reticulócitos podem ser divididos em: semi-automatizados, que exigem que a amostra seja preparada manualmente, através de técnica e reativo específico do fabricante e só então introduzida no equipamento para leitura; e automatizados, nos quais a amostra de sangue é diretamente inserida no equipamento, com aumento da eficiência por eliminar erros pré-analíticos de diluição, coloração e incubação (PIERRE, 2002). Os reagentes comumente empregados são: o azul de metileno novo (ABBOTT; BECKMAN COULTER); oxazina (BAYER); marcadores fluorescentes, como thiazole Orange (HORIBA ABX), auramina O (SYSMEX), corifosfina O (BECKMAN COULTER) (LEWIS *et al.*, 2006; ZANDECKI *et al.*, 2007).

De forma semelhante à leitura empregada para contagem diferencial dos glóbulos vermelhos, os reticulócitos apresentam uma dispersão de luz em 10° , mas com dispersão diferente em ângulo de 90° . A dispersão da luz entre os ângulos 0 e 10° é útil para diferenciar os reticulócitos maduros e imaturos, sendo influenciados

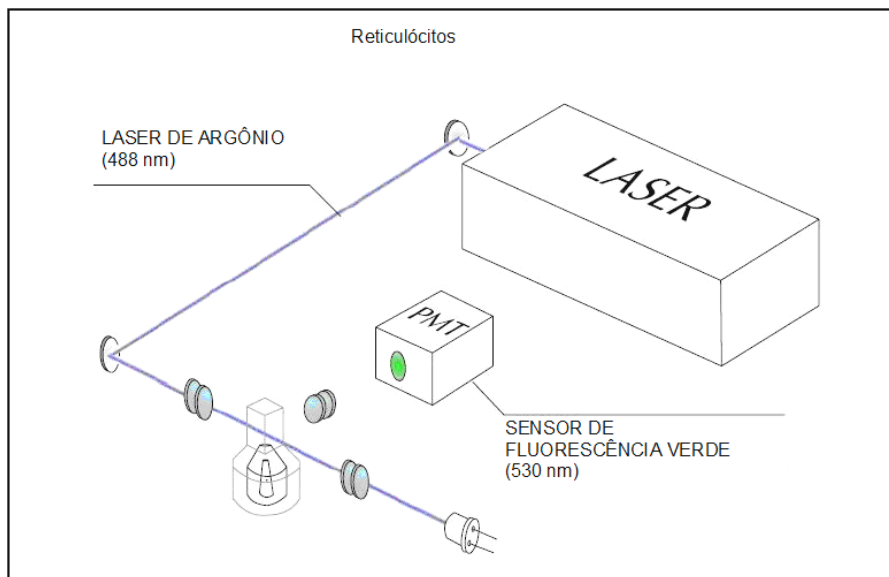


FIGURA 16 - REPRESENTAÇÃO DO SISTEMA DE LEITURA DE RETICULÓCITOS EM EQUIPAMENTOS ELETRÔNICOS
 FONTE: Adaptada de: Horiba Medical (2011). Disponível em: <http://www.horiba.com/br/medical/technologies/>

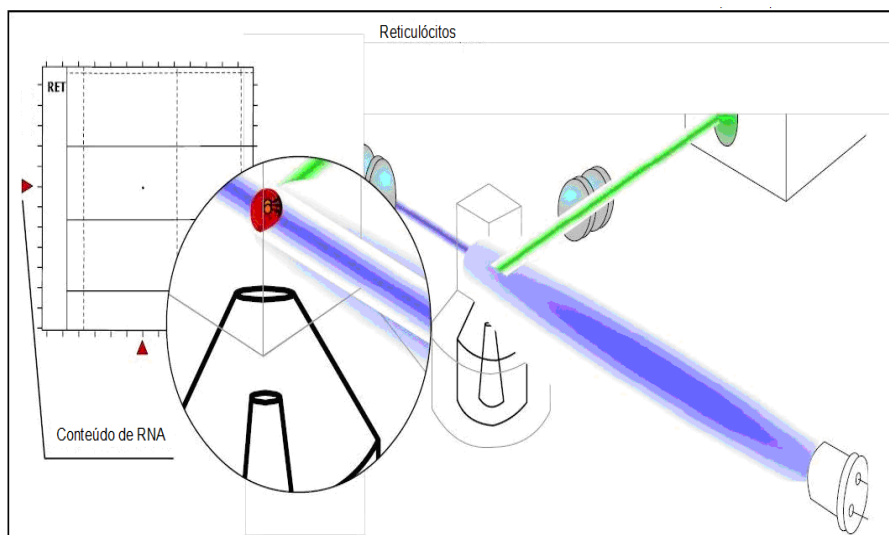


FIGURA 17 - REPRESENTAÇÃO DO SISTEMA DE LEITURA DE RETICULÓCITOS EM EQUIPAMENTOS ELETRÔNICOS
 NOTA: momento em que um reticulócito passa pelo canal de leitura e é identificado pelo equipamento.
 FONTE: Adaptada de: Horiba Medical (2011). Disponível em: <http://www.horiba.com/br/medical/technologies/>

pelos intervalos de referência em função dos desvios padrão. De modo geral, os equipamentos que utilizam corantes supra vitais os desvios padrão são maiores

devido a sua baixa sensibilidade de identificação e discriminação, quando comparados com os equipamentos que utilizam reagentes fluorescentes que possuem maior sensibilidade. São empregados filtros quando se emprega fluorescência para excitação e para emissão de luz. Esta intensidade da luz é emitida de acordo com a quantidade de RNA do reticulócito. O parâmetro utilizado para identificá-lo e obter informações como a idade, sendo separados em baixa, média e alta maturidade, onde se tem respectivamente: grande, média e baixa quantidade de grânulos reticulares, a fim de compor o reticulocitograma. O parâmetro fornecido pelo equipamento chamado IRF (índice de reticulócitos imaturos) é composto pelos reticulócitos com baixa e média maturidade destas células (RILEY *et al.*, 2001; BUTTARELLO *et al.*, 2002).

Alguns fatores podem interferir nas contagens automatizadas dos reticulócitos como plaquetas gigantes ou agrupadas, leucócitos alterados ou fragmentados, eritrócitos com inclusões como: corpúsculos de Howell-Jolly, corpos de Pappenheimer, corpos de Heinz ou ponteados basófilos, que podem ser confundidas com as granulações dos reticulócitos, assim também esferócitos e eritrócitos com hemoglobina H podem ser contados como reticulócitos. Entretanto, esse tipo de interferência pode variar de acordo com o equipamento utilizado. Para os equipamentos que utilizam a fluorescência há outros interferentes como: de parasitas como *Babesia* sp e *Plasmodium* spp,. Outras causas de interferência na contagem automatizada de reticulócitos são relatadas como a presença de aglutininas frias, paraproteínas e hemólise na amostra (LEWIS *et al.*, 2006; ZANDECKI *et al.*, 2007).

Segundo LEWIS *et al.*, (2006), os métodos manual e automatizado para determinação de reticulócitos são aceitáveis e se correlacionam bem, porém segundo GREER *et al.*; (2009) o método automatizado é superior devido a baixa influência do microscopista e maior grau de reprodutibilidade por contar maior número de células.

2.10 MEIOS PARA PRESERVAÇÃO E FIXAÇÃO CELULAR

O principal objetivo do estudo da preservação de sangue, em especial a sua fração eritrocitária, tem sido a obtenção de amostras para transfusão, nas quais as

células devem ser mantidas vivas. No entanto, a partir da necessidade de implantação de sistemas de controle de qualidade em laboratório, passou-se a estudar também formas de preservação com base na fixação celular (LEONART, 1994).

A forma mais acessível de preservação de sangue, e também a mais largamente investigada, foi o armazenamento em condições hipotérmicas, em temperatura mais baixa que a fisiológica e mais alta que o ponto de congelamento. Em temperaturas mantidas abaixo da fisiológica, são inibidos processos metabólicos dependentes de temperatura, os quais esgotariam metabólitos celulares críticos e acumulariam danos às células (HÖGMAN *et al.*, 1991).

Em trabalhos sobre a preservação de eritrócitos em ADSOL, demonstrou-se que a determinação da porcentagem de eritrócitos que mantém a forma discóide correlaciona-se positivamente com os níveis eritrocitários de ATP e pode ser utilizada como parâmetro para o controle de qualidade de unidades de eritrócitos para transfusão (LEONART *et al.*, 1997; TOMCZAK *et al.*, 2010).

A solução de Alsever, um anticoagulante e preservador isotônico do sangue, foi descrita em 1941, e tem sido usada desde então como solução anticoagulante e conservante de eritrócitos. É uma solução isotônica, composta por glicose, cloreto de sódio, citrato trissódico, ácido cítrico e água bidestilada, e permite o armazenamento de sangue total e hemácias em refrigeração. Ela passou por modificações como a adição de adenina, inosina, cloranfenicol e neomicina. O teste de qualidade da solução consiste de medição de pH, presença de hemólise e reatividade sorológica para antígenos D, Fy^a e M (MARTINCIC *et al.*, 2008).

O emprego de fixadores destina-se a conservar as características morfológicas e macromoleculares dos tecidos ou células, por períodos distintos, conforme sua natureza. Os mecanismos físico-químicos pelos quais eles atuam diferem, podendo causar insolubilização, estabilização ou inativação dos componentes macromoleculares dos tecidos e das células. *À priori*, os fixadores agem inativando biomoléculas intrínsecas, em especial enzimas proteolíticas e, na sequência, atuam protegendo a amostra de danos extrínsecos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005).

A fixação pode ser realizada por agentes físicos, ou substâncias químicas, os fixadores. Sua utilização tem por finalidade impedir a autólise ou a degradação bacteriana do material biológico a ser analisado, propiciando um enrijecimento de

órgãos e tecidos, conservando suas características morfológicas e de macromoléculas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005).

Há distintos mecanismos pelos quais os fixadores químicos podem reagir. As principais bases macromoleculares onde eles atuam são: proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos e lipídeos, propiciando a sua estabilização, coagulação ou insolubilização, causando uma precipitação. Dentre os compostos químicos que podem ser usados como substâncias fixadoras, pode-se citar: álcool etílico e álcool metílico; aldeídos, como formaldeído, glutaraldeído e paraformaldeído; tetróxido de ósmio, eficiente na fixação de lipídeos; ácido pícrico e ácido crômico, fixadores de proteínas (CARVALHO & RECCO-PIMENTEL, 2001).

O mecanismo pelo qual o álcool etílico e o álcool metílico atuam baseia-se na redução da constante isoelétrica das proteínas, levando à sua precipitação com quebra das ligações hidrofílicas, importantes na manutenção da sua estrutura terciária, o que os caracteriza como agentes desnaturantes de proteínas (BENCROFT & STEVENS, 1990).

Os aldeídos como formaldeído, glutaraldeído e paraformaldeído, também atuam sobre as proteínas, mas sua ação promove a formação de ligações cruzadas entre cadeias polipeptídicas, ação conhecida como *crosslinking* de proteínas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005).

A fixação com glutaraldeído mantém os eritrócitos com alterações mínimas na morfologia celular. Entretanto, esta ação depende, não só da concentração de glutaraldeído e do tempo de fixação, como também da morfologia celular no momento da fixação e do estado inicial das células (RUDENKO *et al.*, 1998).

Eritrócitos parcialmente fixados com glutaraldeído foram utilizados na obtenção de amostras para controle de qualidade em hematologia (MORGAN *et al.*, 1978; LEONART *et al.*, 1989); como suportes para reações imunológicas (BARRET *et al.*, 1985; COOMBS, 1987), na manutenção da glicólise e do gradiente de cátions (PARKER, 1984); na inibição da hemólise (CORY & MEISELMAN, 1978; ARAKI & RIFKIND, 1981), na manutenção da forma eritrocitária (ESKELINEN & SAUKKO, 1983), no transporte de enzimas para o fígado de pacientes deficientes, e na ligação reversível com antibióticos do tipo antraciclinas (ATTAULLAKHANOV *et al.*, 1996).

No estudo das proteínas da membrana eritrocitária, através da eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE), foram observadas variações, de acordo com as condições de preservação, desde a sua

ausência, até a formação de oligômeros de alto peso molecular, resultantes de reações de proteólise e oxidação e da interação entre as moléculas protéicas e ou seus fragmentos (WOLFE, 1985). Demonstrou-se que eritrócitos preservados em ADSOL mantêm as atividades de diversas enzimas da via glicolítica e do ciclo das pentoses em níveis aceitáveis, bem como a integridade das proteínas da membrana, durante até 14 semanas (LEONART, 1994).

Eritrócitos mantidos em meio CE também não apresentam alterações detectáveis nas frações protéicas da membrana em SDS-PAGE, durante 14 semanas (LEONART, 1994). O glutaraldeído, entretanto, quando utilizado como fixador da membrana eritrocitária, promove a formação de oligômeros, por estabelecimento de ligações *crosslinking* entre as moléculas protéicas (WOLFE, 1985). Esse efeito foi confirmado em amostras preservadas após a fixação parcial em glutaraldeído (LEONART, 1994) e, tem sido estudado com diferentes finalidades, incluindo o seu emprego em hemoterapia e a obtenção de amostras estáveis para o controle de qualidade em hematimetria (LEONART *et al.*, 1989; 1992; 1994; 1999.; EMENDÖRFER *et al.*, 1998; 1999; 2000., PROCHASKA *et al.*, 2001; 2002; 2003, HAUSER *et al.*, 2003a; 2003b; 2004., FEISTLER *et al.*, 2004; 2005., SALMAZO NEIVA *et al.*, 2006; 2007; 2008).

A partir dos conhecimentos já acumulados sobre a preservação de eritrócitos e com base em trabalhos que mostram a possibilidade de estabilidade de antígenos eritrocitários, bem como no fato de que a fixação das estruturas da célula pode vir a retardar a maturação da mesma, optou-se por estudar antígenos eritrocitários e reticulócitos em amostras de eritrócitos preservados em meio CE e submetidos à fixação parcial com glutaraldeído.



3 OBJETIVOS

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- ◆ Estudar a preservação de eritrócitos humanos em meio de conservação isosmolar, contendo Na_2HPO_4 , glicose, EDTANa_2 , KCl, NaCl, citrato de sódio e albumina bovina (meio CE), para emprego em exames imuno-hematológicos e controle de qualidade de contagem de reticulócitos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ◆ Testar a estabilidade de antígenos de importância clínica em eritrócitos preservados em meio CE, entre eles: A, B, D, C^w , C, c, E, e, K, k, kp^b , Jk^a , Jk^b , P1, Le^a , Le^b , Lu^b , M, N, S, s, Fy^a , Fy^b e Di^a .
- ◆ Testar a estabilidade da contagem de reticulócitos em amostras de eritrócitos parcialmente fixados com glutaraldeído e preservados em meio CE.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Para ensaios de antígenos eritrocitários

Foram separadas amostras de 10 ml de sangue venoso de doadores do Centro de Hemoterapia e Hematologia do Paraná (HEMEPAR), coletadas e processadas de acordo com as normas técnicas estabelecidas pela Resolução da Diretoria Colegiada do Ministério da Saúde nº153, de 14 de junho de 2004. Após a retirada das amostras, as bolsas foram devolvidas ao serviço, podendo ser utilizadas sem prejuízo para os estoques de sangue do HEMEPAR. No momento da coleta, todos os doadores de sangue do HEMEPAR assinam um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), no qual os mesmos declaram expressamente consentir em doar o seu sangue para qualquer paciente que dele necessite e para a realização de todos os exames laboratoriais exigidos pelas leis e normas técnicas vigentes. Desta forma, estes sujeitos da pesquisa ficaram desobrigados de assinar um novo documento para que seu sangue fosse incluído neste estudo, de acordo com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (CEP–SD), sob protocolo CEP/SD 814.149.09.10 e CAAE 0068.0.091.000-09 (ANEXO II). Foram coletadas amostras suficientes para se obter o maior número possível de antígenos eritrocitários de importância clínica transfusional de acordo com Greer *et al.*, (2009) (Tabela 1), incluindo os antígenos pertencentes aos grupos: A, B, D, C^w, C, c, E, e, K, k, kp^b, Jk^a, Jk^b P1, Le^a, Le^b, Lu^b, M, N, S, s, Fy^a, Fy^b e Di^a.

4.1.2 Para ensaios de contagem de reticulócitos

Foram coletados 9 ml de sangue venoso de 10 indivíduos adultos de ambos os sexos, selecionados aleatoriamente entre alunos e funcionários da UFPR e que, após esclarecimento a respeito da importância deste trabalho, se apresentaram como voluntários e assinaram o TCLE (ANEXO I), conforme apresentado ao CEP-SD, sob protocolo CAAE 0068.0.091.000-09 (ANEXO II).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparo do meio CE

Preparo do meio CE de preservação, segundo Salmazo Neiva *et al.* (2006) - todo o material a ser utilizado foi lavado em detergente neutro, rigorosamente enxaguado por diversas vezes em água pura tipo II e autoclavado; os compostos (Na_2HPO_4 8 mmoles/l, glicose 20 mmoles/l, EDTANa_2 1 mmol/l, KCl 8 mmoles/l, NaCl 75 mmoles/l, citrato de sódio 40 mmoles/l e albumina bovina (AB) 6g/l) foram pesados e dissolvidos em água ultra pura tipo I. Após seu preparo, as soluções foram submetidas ao processo de tindalização por um período de três dias, visando à inibição do crescimento de microorganismos. Findo o processo de tindalização, a solução foi conservada entre 2 e 6°C.

4.2.2 Preparo de amostras para pesquisa de antígenos eritrocitários

As amostras de 10 ml de sangue venoso, separadas a partir das bolsas de doação de sangue, foram obtidas por centrifugação a 900 x g por 25 min (centrífuga CELLSEP 6/120R-SANYO), e os eritrócitos ressuspensos em meio CE tindalizado, obtendo-se volume globular (VG) de 40%. Estas suspensões foram homogeneizadas durante 15 min e fracionadas em alíquotas de 1 ml, acondicionadas em tubos plásticos estéreis, do tipo Eppendorf, e mantidas em refrigerador entre 2 e 6 °C.

Para a investigação de antígenos eritrocitários, empregou-se técnica para pesquisa, identificação e titulação de antígenos em gel de acrilamida dextrana, contida em microtubo. Optou-se por esta técnica, por ser metodologia já validada e empregada rotineiramente no laboratório de imuno-hematologia do HEMEPAR.

Os reativos utilizados foram marca DIAMED. Os procedimentos técnicos foram seguidos de acordo com a metodologia do fabricante - técnica em gel ID-Micro Typing System. Empregou-se os seguintes cartões de identificação: ID-ABO/Rh (Figura 18), ID-Rh-Subgrupos+C^w+K (Figura 19), ID-Antigen Perfil I (Figura 20), ID-Antigen Perfil II (Figura 21), ID-Antigen Perfil III (Figura 22), os quais apresentam

anticorpos suspensos em gel para a determinação dos antígenos: A, B, D, C^w, C, c, E, e, K, k, kp^b, Jk^a, Jk^b, P1, Le^a, Le^b, Lu^b, M, N, S, s, Fy^a, Fy^b. Para pesquisa de antígenos Di^a, utilizou-se ID-Cartão/Liss Coombs e anti-soro específico (Lote 100512).

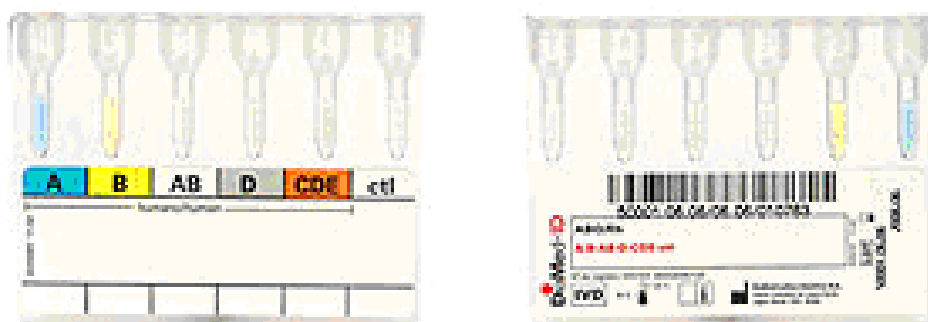


FIGURA 18 - ID-ABO/Rh DE ANTISOROS ESPECÍFICOS PARA ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS DOS TIPOS A-B-AB-D-CDE-cti

NOTA: A anticorpo monoclonal, B anticorpo monoclonal, AB anticorpos monoclonais, D anticorpo monoclonal.

FONTE: Diamed (2011) Disponível em:

<http://www.diamed.com.br/cmi/Pagina.aspx?122>

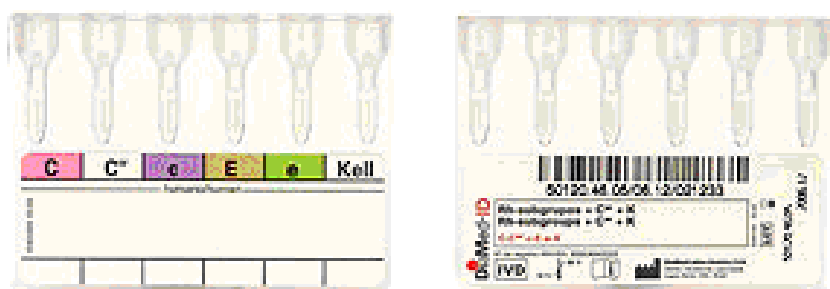


FIGURA 19 - ID-Rh-Subgrupos+C^w+K DE ANTISOROS ESPECÍFICOS PARA ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS DOS TIPOS C-C^w-c-E-e-Kell

NOTA: C/C^w/c anticorpos monoclonais, E/e anticorpos monoclonais, Kell 1, anticorpos humanos

FONTE: Diamed (2011) Disponível em:

<http://www.diamed.com.br/cmi/Pagina.aspx?134>



FIGURA 20 - ID-PERFIL I DE ANTISOROS ESPECÍFICOS PARA ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS DOS TIPOS P¹-Le^a-Le^b-Lu^a-Lu^b-ctl

NOTA: P¹ anticorpo monoclonal, Lea/Leb anticorpos monoclonais, Lua/Lub anticorpos humanos.

FONTE: Diamed (2011) Disponível em:

<http://www.diamed.com.br/cmi/Pagina.aspx?137>



FIGURA 21 - ID-PERFIL II DE ANTISOROS ESPECÍFICOS PARA ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS DOS TIPOS k-Kp^a-Kp^b-Jk^a-Jk^b-ctl

NOTA: Jka/Jkb anticorpos monoclonais, k/Kpa/Kpb anticorpos humanos.

FONTE: Diamed (2011) Disponível em:

<http://www.diamed.com.br/cmi/Pagina.aspx?138>



FIGURA 22 - ID-PERFIL III DE ANTISOROS ESPECÍFICOS PARA ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS DOS TIPOS M-N-S-S-FYA-FYB

Nota: M/N - anticorpos monoclonais; S/s/Fya/Fyb - anticorpos humanos.

FONTE: Diamed (2011) Disponível em:

<http://www.diamed.com.br/cmi/Pagina.aspx?139>

A técnica de determinação de antígenos em gel utiliza o princípio da centrifugação controlada de eritrócitos através de gel de dextrana-acrilamida e reagentes apropriados pré-distribuídos num microtubo especialmente projetado. Cada microtubo é composto por uma câmara de reação superior, que é mais calibrosa, e uma parte inferior longa e estreita contendo os microtubos, em vez de tubos de ensaio.

A coluna de cada microtubo contém as partículas de gel suspensas em um diluente ou reagente. A forma e o comprimento proporcionam uma grande área de superfície para contato prolongado dos eritrócitos com as partículas de gel no sistema de teste durante a fase de centrifugação.

As partículas de gel são pérolas de dextrana-acrilamida e compõem 75% da mistura gel-líquido pré-carregada em cada microtubo. As partículas de gel são porosas e funcionam como meio de reação e filtro. O gel desempenha a função de peneira molecular com base no diâmetro dos aglutinados eritrocitários presentes no microtubo durante a centrifugação. Aglutinados grandes são capturados no gel, não lhes sendo permitido o deslocamento através do gel durante a centrifugação do cartão. Quaisquer eritrócitos aglutinados presentes permanecem fixos ou suspensos no gel. Eritrócitos não aglutinados podem deslocar-se sem qualquer impedimento através de toda extensão do microtubo, formando um botão no fundo, depois da centrifugação.

As reações de aglutinação em gel são estáveis, permitindo a revisão durante muitas horas.

4.2.3 Procedimento dos testes imuno-hematológicos

4.2.3.1 Preparo das suspensões de eritrócitos

Para cartões dos Antígenos ABO/Rh, ID-DiaClon Rh-Subgrupos+K, Perfil I e II preparou-se suspensões de eritrócitos a 5% em solução de bromelina modificada (ID-diluent 1), seguindo as seguintes recomendações: após deixar todos os reagentes atingirem temperatura ambiente, dispensar 0,5 ml de ID-diluent 1 em tubo de hemólise, adicionar 50 µl de sangue total ou 25 µl de concentrado de eritrócitos, misturar suavemente, incubar a suspensão de eritrócitos durante 10 minutos a

temperatura ambiente (18° a 25°C), utilizando-a até 15 minutos após incubação. Para cartões dos antígenos Perfil III e antígenos Di^a preparou-se suspensões de eritrócitos a 0,8% em solução de baixa força iônica - LISS modificado (ID-diluent 2), dispensou-se 1,0 ml de ID-diluent 2 em tubo de hemólise, adicionou-se 10 µl de concentrado de eritrócitos, misturou-se suavemente. Esta suspensão pode ser utilizada imediatamente após o preparo.

4.2.3.2 Técnica de fenotipagem dos antígenos

Para ID-ABO/Rh, ID-Rh-Subgrupos+C^w+K, e ID-Antigen I e II: 1. Identificou-se o cartão com o número da amostra; 2. Retirou-se a película de alumínio que recobria todos os microtubos necessários, segurando os cartões na posição vertical; 3. Pipetou-se 10 ou 12,5 µl de suspensão de eritrócitos em solução ID-Diluent 1 em todos os microtubos; 4. Centrifugou-se os cartões durante 10 minutos (ID centrífuga); 5. Procedeu-se a leitura dos cartões.

Para ID-Antigen III: 1. Identificou-se o cartão com o número da amostra; 2. Retirou-se a película de alumínio de todos os microtubos necessários, segurando os cartões na posição vertical; 3. Pipetou-se 50 µl de suspensão de eritrócitos em ID-Diluent 2 para todos os microtubos; 4. Adicionou-se 50 µl de soro-teste ID aos microtubos apropriados; 5. Incubou-se o cartão ID durante 10 min à temperatura ambiente (18° a 25°C); 6. Centrifugou-se o cartão I D durante 10 min (ID centrífuga), 7. Procedeu-se a leitura dos cartões.

Para antígenos Dia: 1. Identificou-se o cartão com o número da amostra; 2. Retirou-se a película de alumínio de todos os microtubos necessários, segurando os cartões na posição vertical; 3. Adicionou-se ao microtubo 50 µl da suspensão de eritrócitos em ID-diluent 2 e 25 µl de soro anti-Dia específico; 4. Incubou-se a 37° em incubadora (ID-Incubadora) por 15 minutos; 5. Centrifugou-se o cartão ID durante 10 min (ID centrífuga), 6. Procedeu-se a leitura dos cartões.

As suspensões de eritrócitos preparadas no 0 (zero), foram testadas para verificar a presença e grau de positividade de antígenos presentes e, a partir deste semanalmente, durante 63 dias.

4.2.3.3 Procedimento para leitura dos cartões de identificação de antígenos

Na interpretação do teste, as próprias reações de aglutinação no teste do gel são graduadas e o grau de positividade é diretamente proporcional à quantidade de antígenos presentes nas hemácias da amostra.

Para realização das análises estatísticas foi estabelecido um *score* para cada grau de positividade da reação observada, 4+ = 4; 3+ = 3; 2+ = 2; 1+ = 1 e reações negativas = 0.

Uma reação de 4+ de positividade para antígenos eritrocitários (Figura 23) é representada por uma banda sólida de eritrócitos aglutinados na parte superior da coluna de gel. Habitualmente, não há eritrócitos visíveis no fundo do microtubo.



FIGURA 23 - POSITIVIDADE PARA ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS: REAÇÃO 4+ (FORTEMENTE POSITIVA)
NOTA: *score* = 4

Uma reação 3+ de positividade para antígenos eritrocitários (Figura 24) é representada por uma quantidade predominante de eritrócitos aglutinados mais na direção do topo da coluna de gel, com poucos aglutinados oscilando por baixo da banda mais espessa. A maior parte dos aglutinados é observada na metade superior da coluna de gel.

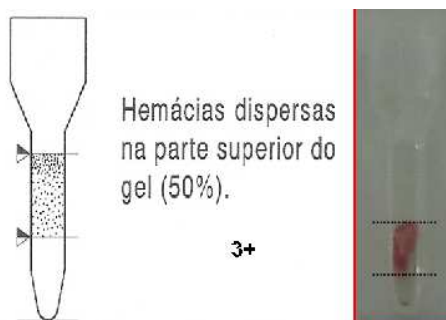


FIGURA 24 - POSITIVIDADE PARA ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS: REAÇÃO 3+ (POSITIVA)
NOTA: *score* = 3

Uma reação 2+ de positividade para antígenos eritrocitários (Figura 25) caracteriza-se por aglutinados eritrocitários dispersos por toda coluna de gel, com poucos aglutinados no fundo do microtubo. Os aglutinados devem estar distribuídos pelas metades superior e inferior do gel.



FIGURA 25 - POSITIVIDADE PARA ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS: REAÇÃO 2+ (MODERADAMENTE POSITIVA)
NOTA: *score* = 2

Uma reação 1+ de positividade para antígenos eritrocitários (Figura 26) se caracteriza por aglutinados eritrocitários observados predominantemente na metade inferior da coluna de gel, com eritrócitos também no fundo. Essas reações podem ser fracas, com alguns aglutinados presentes na área do gel imediatamente acima do botão eritrocitário no fundo do microtubo.



FIGURA 26 - POSITIVIDADE PARA ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS: REAÇÃO 1+ (FRACAMENTE POSITIVA)
NOTA: *score* = 1

Uma reação negativa para antígenos eritrocitários (Figura 27) é representada por eritrócitos que formam um sedimento bem delineado no fundo do microtubo. O gel acima do sedimento eritrocitário permanece transparente e isento de aglutinados.



FIGURA 27 - REAÇÃO NEGATIVA PARA ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS
NOTA: *score* = 0

Reações de campo misto podem ser identificadas como uma camada de aglutinados eritrocitários no topo do gel, acompanhada por um sedimento de células não aglutinadas no fundo do microtubo. Antes de interpretar reações de campo misto, deve-se levar em consideração a história clínica do paciente e o tipo de teste efetuado.

Reações negativas podem ter aspecto de reações de campo misto quando amostras de soro completamente coagulado são utilizadas no teste de gel. Filamentos de fibrina presentes nesses soros podem capturar eritrócitos não aglutinados, formando uma linha delgada no topo do gel. Outras células não aglutinadas transitam através do gel durante a centrifugação e deslocam-se até o fundo do microtubo.

4.2.4 Preparo de amostras para contagem de reticulócitos

4.2.4.1 Coleta das amostras

As amostras de 9 ml de sangue venoso foram colocadas em tubos Falcon com capacidade para 12 ml, na proporção de 3:1 em meio CE tinalizado, homogeneizadas por 10 min, centrifugadas a 900 x g por 25 min (centrífuga CELLSEP 6/120R-SANYO). Na sequência os eritrócitos foram ressuspensos em meio CE tinalizado, contendo 14 mmoles/l de glutaraldeído, incubadas durante 60 min sob constante homogeneização por rotação (homogeneizador de sangue AP 22

PHOENIX). Segue nova centrifugação 900 x g por 25 min (centrífuga CELLSEP 6/120R-SANYO). O sedimento de eritrócitos foi ressuspenso em meio CE para a obtenção de VG igual a 40 % e fracionado em alíquotas de 1 ml, acondicionadas em tubos plásticos estéreis, do tipo Eppendorf, e mantidas em refrigerador entre 2º e 6 °C.

4.2.4.2 Contagem manual de reticulócitos

Para a técnica de preparo das amostras para contagem de reticulócitos pelo método manual padronizou-se a utilização de iguais volumes de suspensão de eritrócitos preservados em meio CE, parcialmente fixados com glutaraldeído e de corante, sendo as amostras preparadas em triplicata. Foram empregadas alíquotas de 200 µl de sangue e 200 µl de solução corante de azul de crezil brilhante comercial na concentração 1% em solução fisiológica, pronta para uso (LABORCLIN). As suspensões obtidas foram misturadas, incubando-se a 37°C durante 20 a 25 min. Após a incubação com o corante, foram feitas finas extensões em lâmina para as contagens.

Para a preparação das lâminas, estendeu-se 5 µl de suspensão de células e corante em lâmina com o auxílio de lâmina extensora, de forma a obter campos sem sobreposição de eritrócitos. Em seguida, as lâminas foram mantidas em estufa a 37°C por 30 min para acelerar a secagem das preparações e evitar, desta forma, que a umidade provocasse o desbotamento dos reticulócitos e dificultasse a sua identificação. A leitura das lâminas foi realizada, em microscópio ótico, imediatamente após a sua preparação.

Os critérios morfológicos adotados para a leitura das lâminas seguiram os princípios preconizados por LEWIS *et al.* (2006). As extensões em lâmina foram analisadas em microscópio ótico com a objetiva de imersão (1000x). Após coloração, pode-se observar a presença de conjuntos de filamentos ou grânulos de RNA corados em azul intenso, dispostos ao acaso no interior dos reticulócitos. Foram considerados reticulócitos células que apresentassem ao menos dois pequenos corpúsculos ou filamentos corados.

A área da preparação analisada foi aquela com campos sem superposição de células, porém não se utilizou campos muito finos, ou seja, com poucas células ou que apresentassem extensos espaços vazios entre as células.

O número de células contadas também foi de acordo com a técnica preconizada por Lewis *et al.*, (2006), que recomenda examinar campos sucessivos até a contagem de ao menos 100 reticulócitos. Inicia-se contando todas as células em 10 campos, para se obter a média do número por campo. Quando o número de reticulócitos exceder a 10%, o exame de um número pequeno de células será suficiente para se obter um erro padrão menor que 10%. Assim, a determinação do número de células a serem contadas baseia-se na porcentagem de reticulócitos encontrados na contagem das primeiras 1.000 a 2.000 células. Um grande número de células deve ser contado quando o número de reticulócitos for baixo e, para se obter um grau aceitável de reprodutibilidade, é tanto maior quanto menor for a porcentagem de reticulócitos, de acordo com a Tabela 4 (p.48). Os resultados das contagens de reticulócitos foram expressos em percentagens.

A preparação e contagem de reticulócitos foram realizadas nas amostras de 10 indivíduos no dia 0 (zero) e a partir deste a cada semana, até que se observasse diminuição significativa em relação às contagens iniciais. Como controles, foram empregadas amostras coletadas em etileno diamino tetracetato tripotássico (EDTAK₃) (1 mg/ml de sangue) preparadas de maneira similar em cada dia do experimento.

4.2.4.3 Contagem automatizada de reticulócitos

A técnica empregada para a metodologia automatizada seguiu as instruções do fabricante. As determinações foram realizadas em equipamento Pentra DX 120 (HORIBA ABX). Antes de iniciar a rotina, foi feita manutenção diária do equipamento e passou-se o reagente Minotrol Retic® da ABX, como amostra de controle de qualidade. Inicialmente, as amostras foram retiradas da refrigeração e mantidas em homogeneizador de sangue (AP 22 PHOENIX), até atingirem a temperatura ambiente, por tempo não inferior a 10 minutos. As amostras foram então processadas por aspiração. O equipamento utiliza tecnologia que combina

impedância, laser de difração com laser de íons argônio e citofluorometria com sensor verde de fluorescência (Figura 16, p.51). A determinação é realizada a partir de suspensão de 0,8 µl de sangue e 2,5 ml de reagente fluorescente thiazole Orange (ABX Fluocyte®).

4.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram analisados com o uso de gráficos de dispersão e pela análise de variância (ANOVA), modelo fatorial com dois critérios utilizando a planilha Excel (Microsoft) e pacote de estatística Statistica 8.0 (StatSoft). A concordância entre os resultados de pesquisa de antígenos durante 63 dias de conservação foi realizado pela análise estatística de correlação intra-classe (ICC) com utilização do pacote estatístico “on-line” da Universidade de Hong Kong:

[http://department.obg.cuhk.edu.hk/researchsupport/IntraClass_correlation.asp].

A significância estatística foi considerada para $p < 0,05$.



5 RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 PRESERVAÇÃO DE ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS

As amostras avaliadas quanto à preservação de antígenos eritrocitários permaneceram estáveis durante 63 dias de preservação em meio CE, como observado para o antígeno Le^b, ilustrado na Figura 28, embora alguns antígenos tenham apresentado pequeno descréscimo de reatividade durante os 63 dias de pesquisa.

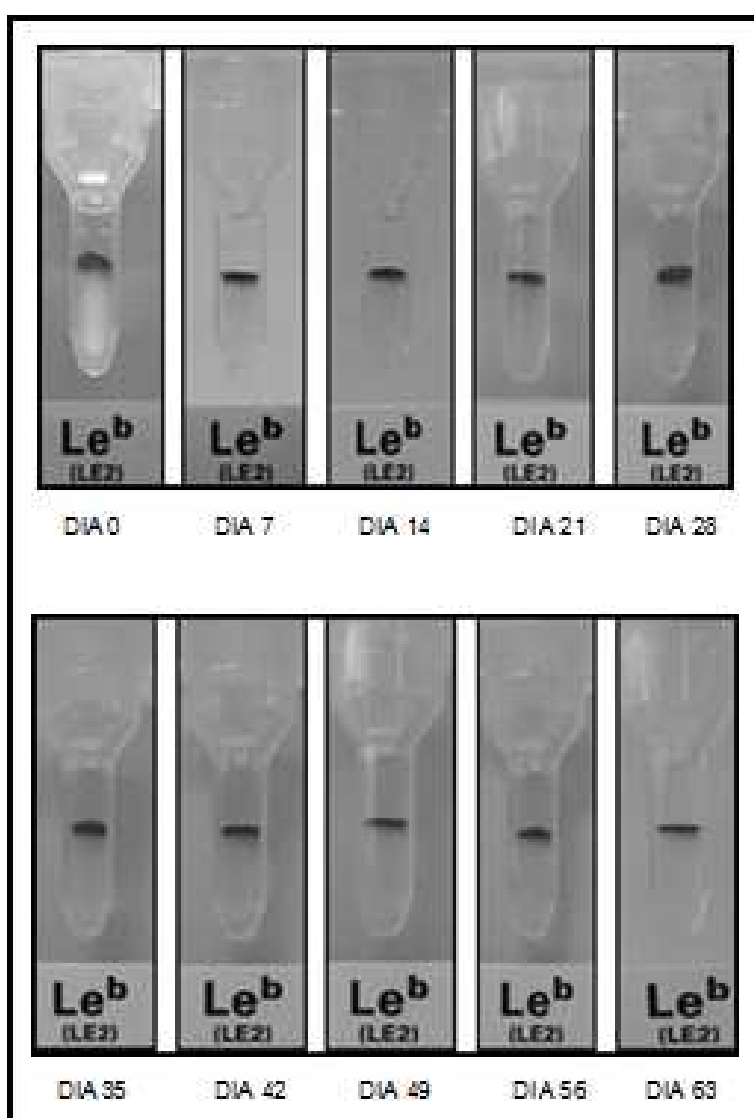


FIGURA 28 - POSITIVIDADE PARA ANTÍGENOS Le^b, DURANTE A PRESERVAÇÃO DE ERITÓCITOS EM MEIO CE

NOTA: Fotografia mostrando a positividade do antígeno Le^b com intensidade 4+ nos dias 0 a 63.

TABELA 5 - CORRELAÇÃO INTRA-CLASSES DE ANTÍGENOS DURANTE 63 DIAS DE PRESERVAÇÃO DE ERITRÓCITOS EM MEIO CE DE ACORDO COM O GRAU DE POSITIVIDADE AO LONGO DO TEMPO

Antígeno	ICC
A	1,000
B	1,000
D	1,000
CW	1,000
C	1,000
C	1,000
E	1,000
E	1,000
K	0,400
K	0,509
Kpb	1,000
Jka	1,000
Jkb	1,000
P1	1,000
Lea	0,552
Leb	1,000
Lub	1,000
M	1,000
N	1,000
S	0,527
S	0,582
Fya	1,000
Fyb	1,000
Dia	1,000

NOTA: ICC – Índice de correlação intra-classe. As correlações foram calculadas entre as classes estabelecidas pela pesquisa de antígenos realizada entre os dias 0 e 63, com 10 amostras independentes.

De acordo com os critérios de Cicchetti & Sparrow (1981), o coeficiente de correlação intra-classe (ICC) é classificado como pobre, < 0,40; regular, 0,40 a 0,59; bom, 0,60 a 0,74; excelente, 0,75 a 1,00. A pesquisa de preservação da reatividade de antígenos eritrocitário em meio CE, mostrou-se excelente para a maioria dos antígenos testados, excetuando-se os antígenos K, k, Le^a, S e s, que apresentaram desempenho na conservação apenas “regular” pelo método de correlação intra-classe (Tabela 5). No entanto, este desempenho “regular” representa apenas

redução da reatividade da reação em um grau de positividade, ou seja, de 4+ para 3+ ou de 3+ para 2+.

Nas Figuras 29 a 36, demonstra-se os resultados encontrados quanto à intensidade de reatividade para os antígenos eritrocitários preservados em meio CE. Houve estabilidade da reatividade frente a seus antígenos por 63 dias de armazenamento a 4 °C, embora para os antígenos K, k, S, s e Le^a houve pequeno decréscimo do grau de reatividade entre os dias 0 (zero) e 63.

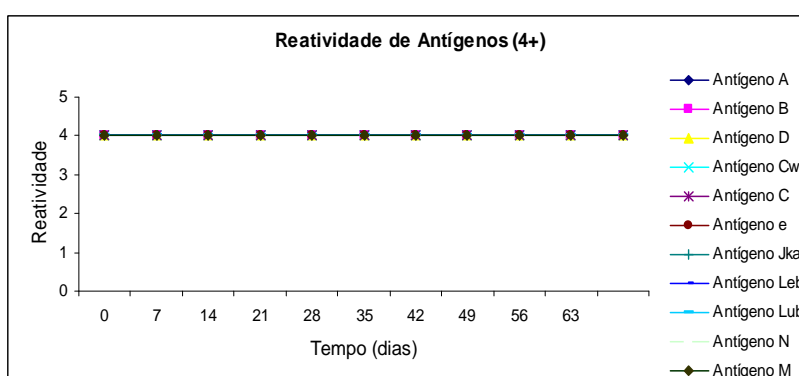


FIGURA 29 - GRAU MÉDIO DE REATIVIDADE DOS ANTÍGENOS A, B, D, C^w, C, e, Jk^a, Le^b, Lu^b, M, N EM ERITRÓCITOS PRESERVADOS EM MEIO CE

NOTA: O gráfico mostra a média de reatividade (4+) para os antígenos em amostras testadas entre os dias 0 e 63.

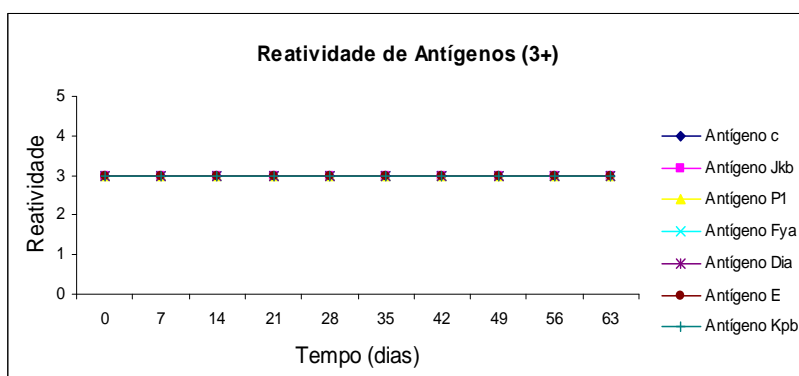


FIGURA 30 - GRAU MÉDIO DE REATIVIDADE DOS ANTÍGENOS c, Jk^b, P1, Fy^a, Di^a, E, Kp^b EM ERITRÓCITOS PRESERVADOS EM MEIO CE

NOTA: O gráfico mostra a média de reatividade (3+) para os antígenos em amostras testadas entre os dias 0 e 63.

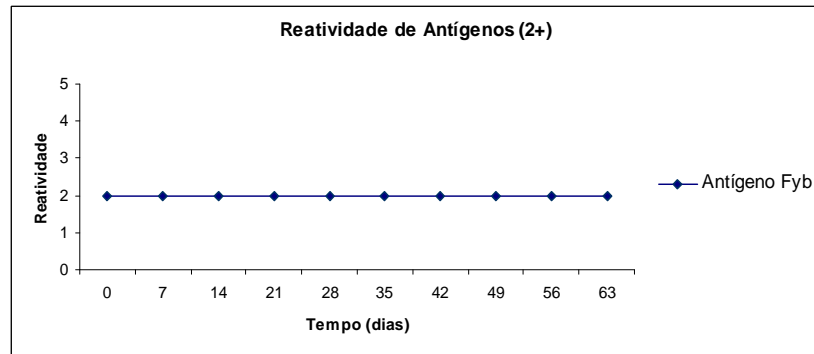


FIGURA 31 - GRAU MÉDIO DE REATIVIDADE DO ANTÍGENO Fy^b EM ERITRÓCITOS PRESERVADOS EM MEIO CE
 NOTA: O gráfico mostra a média de reatividade (2+) para os antígenos em amostras testadas entre os dias 0 e 63.

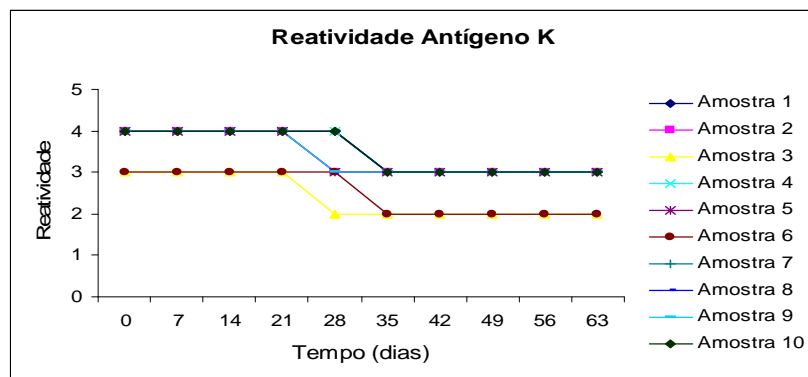


FIGURA 32 - GRAUS DE REATIVIDADE DO ANTÍGENO K EM ERITRÓCITOS PRESERVADOS EM MEIO CE
 NOTA: O gráfico mostra a reatividade para o antígeno K em 10 amostras testadas entre os dias 0 e 63.

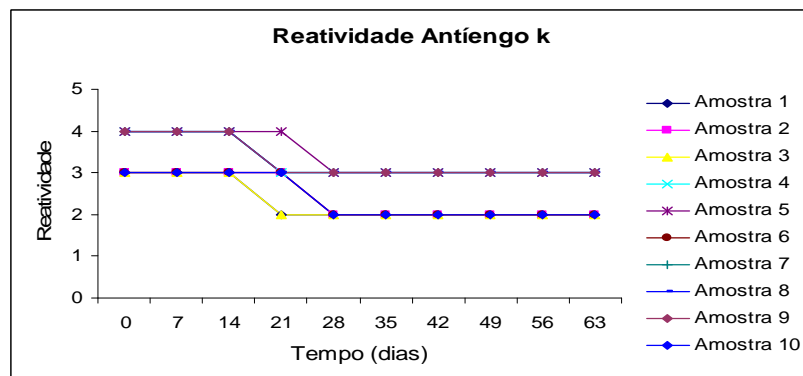


FIGURA 33 - GRAUS DE REATIVIDADE DO ANTÍGENO k EM ERITRÓCITOS PRESERVADOS EM MEIO CE
 NOTA: O gráfico mostra a reatividade para o antígeno k em 10 amostras testadas entre os dias 0 e 63.

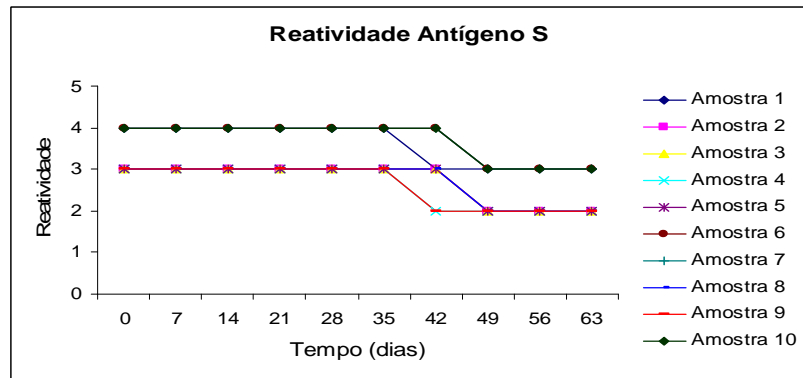


FIGURA 34 - GRAUS DE REATIVIDADE DO ANTÍGENO S EM ERITRÓCITOS PRESERVADOS EM MEIO CE
 NOTA: O gráfico mostra a reatividade para o antígeno S em 10 amostras testadas entre os dias 0 e 63.

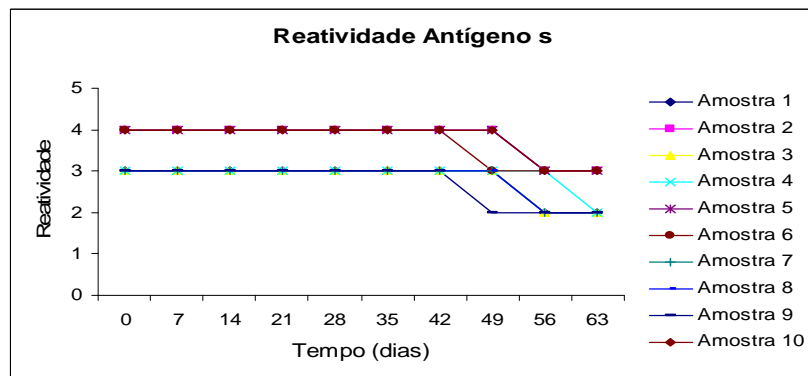


FIGURA 35 - GRAUS DE REATIVIDADE DO ANTÍGENO s EM ERITRÓCITOS PRESERVADOS EM MEIO CE
 NOTA: O gráfico mostra a reatividade para o antígeno s em 10 amostras testadas entre os dias 0 e 63.

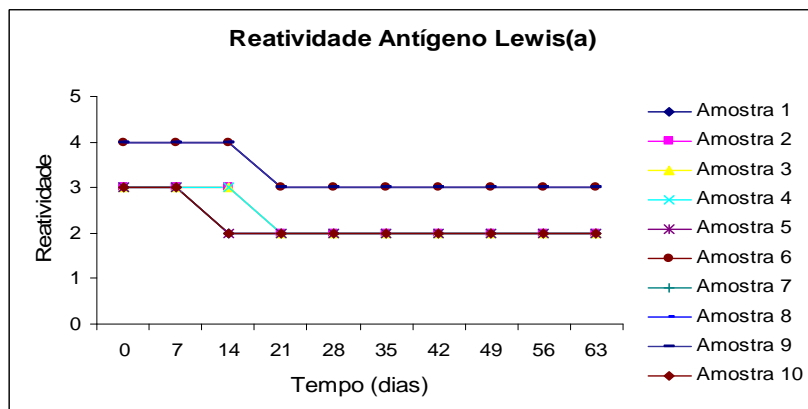


FIGURA 36 - GRAUS DE REATIVIDADE DO ANTÍGENO Le^a EM ERITRÓCITOS PRESERVADOS EM MEIO CE
 NOTA: O gráfico mostra a reatividade para o antígeno Le^a em 10 amostras testadas entre os dias 0 e 63.

5.2 PRESERVAÇÃO DA CONTAGEM DE RETICULÓCITOS

Os resultados parciais obtidos a partir da contagem de reticulócitos em quatro amostras de suspensões de eritrócitos em meio CE, parcialmente fixados por glutaraldeído, estão apresentados na Tabela 6, indicando que houve estabilidade na concentração de reticulócitos durante 28 dias de preservação.

TABELA 6 - CONTAGEM MANUAL DE RETICULÓCITOS EM AMOSTRAS DE ERITRÓCITOS PARCIALMENTE FIXADOS EM GLUTARALDEÍDO E PRESERVADOS EM MEIO CE, RESULTADOS EM % (N=4)

Amostra	Dias						
	0	7	14	21	28	35	42
1	1,17	1,1	1,08	1,1	1,08	0,91	0,6
2	0,8	0,87	0,92	0,88	0,77	0,69	0,51
3	1,42	1,47	1,4	1,38	1,36	1,12	0,88
4	1,21	1,18	1,2	1,19	1,15	1,04	0,71

NOTA: As contagens manuais de reticulócitos foram feitas, em triplicata. O número de eritrócitos contados foi de acordo com a Tabela 4 (DACIE & LEWIS, 1965) de influência da concentração de reticulócitos na exatidão das contagens.

Na Tabela 7, podem-se observar os resultados encontrados para 10 amostras de eritrócitos parcialmente fixadas por glutaraldeído, preservadas durante 28 dias em meio CE. As contagens foram realizadas em triplicata, em equipamento automatizado Pentra 120 DX (HORIBA ABX).

TABELA 7 - CONTAGEM AUTOMATIZADA DE RETICULÓCITOS EM AMOSTRAS DE ERITRÓCITOS PARCIALMENTE FIXADOS EM GLUTARALDEÍDO E PRESERVADOS EM MEIO CE (N=10)

AMOSTRA	Dias				
	0	7	14	21	28
1	1,68	1,67	1,58	1,99	2
2	1,65	0,84	1,57	1,05	1,98
3	1,61	1,44	1,47	1,4	2,03
4	2,39	1,86	1,11	1,1	1,52
5	2,98	2,69	3,05	3,07	3,45
6	1,35	0,77	1,14	1,41	2,15
7	2,23	1,18	1,55	1,13	1,78
8	1,43	1,52	1,55	1,54	1,41
9	1,14	1,38	1,72	1,64	1,85
10	1,99	2,03	2,6	2,86	3,26

NOTA: As contagens foram realizadas em aparelho Pentra 120 DX em triplicata.

TABELA 8 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA MODELO FATORIAL COM DOIS CRITÉRIOS PARA A CONTAGEM AUTOMATIZADA DE RETICULÓCITOS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CONSERVAÇÃO

	SQ	GL	QM	F	P
Amostras	13,7526	9	1,5281	13,250	0,000000
Dias	1,9915	4	0,4979	4,317	0,005913
Erro	4,1518	36	0,1153		

NOTA: SQ – Soma de quadrados; GL – graus de liberdade; QM - Quadrado médio; F – teste de comparação de variância pela distribuição de Fisher; p – nível de significância da hipótese de nulidade.

A análise de variância para os dados das contagens de reticulócitos, ilustrada na Tabela 8, indica que houve diferença entre amostras ($p < 0,05$), o que é desejado, demonstrando que as amostras continham valores baixos e altos. Os valores médios observados estão descritos na Tabela 9 e na Figura 37.

No que se refere à variação da contagem automatizada de reticulócitos preservados durante 28 dias, os resultados indicam uma pequena flutuação, com média geral em torno de 1,8%, desvio padrão 0,64%, que foi exatamente a média dos valores iniciais (Tabela 7, Figura 38).

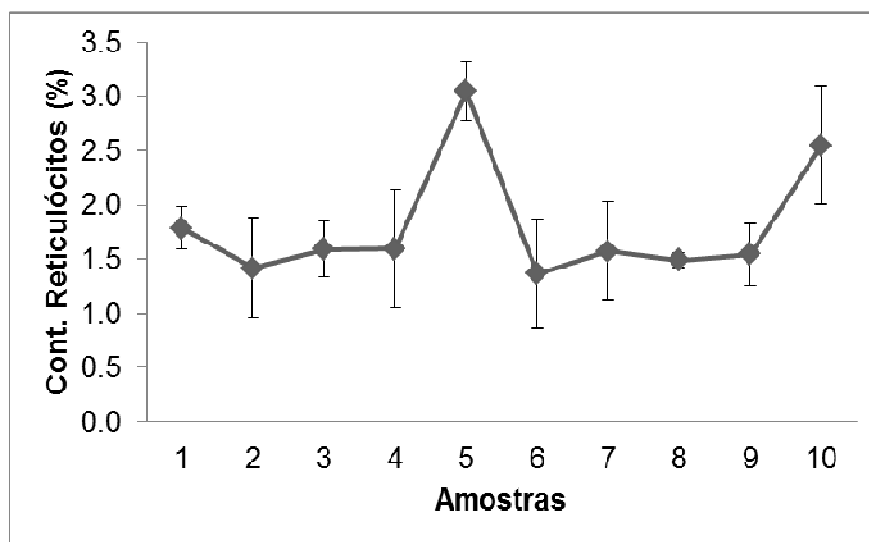


FIGURA 37 - CONTAGENS AUTOMATIZADA DE RETICULÓCITOS POR AMOSTRAS DE ERITRÓCITOS PARCIALMENTE FIXADOS EM GLUTARALDEÍDO E PRESERVADOS EM MEIO CE DURANTE 28 DIAS

NOTA: As barras de erro representam os desvios padrão.

TABELA 9 - TABELAS DE MÉDIAS DAS CONTAGENS AUTOMATIZADAS DE RETICULÓCITOS POR AMOSTRAS E POR DIA DE PRESERVAÇÃO DE ERITRÓCITOS EM MEIO CE, APÓS FIXAÇÃO PARCIAL EM GLUTARALDEÍDO

Total	Fator	Média	dp	N
		1,8	0,64	50
Amostra	1	1,78	0,2	5
	2	1,42	0,46	5
	3	1,59	0,26	5
	4	1,6	0,55	5
	5	3,05	0,27	5
	6	1,36	0,51	5
	7	1,57	0,45	5
	8	1,49	0,07	5
	9	1,55	0,28	5
	10	2,55	0,54	5
Dia	0	1,85	0,56	10
	7	1,54	0,57	10
	14	1,73	0,62	10
	21	1,72	0,72	10
	28	2,14	0,68	10

NOTA: dp - Desvio padrão; N - tamanho amostral.

Os experimentos foram realizados em triplicata.

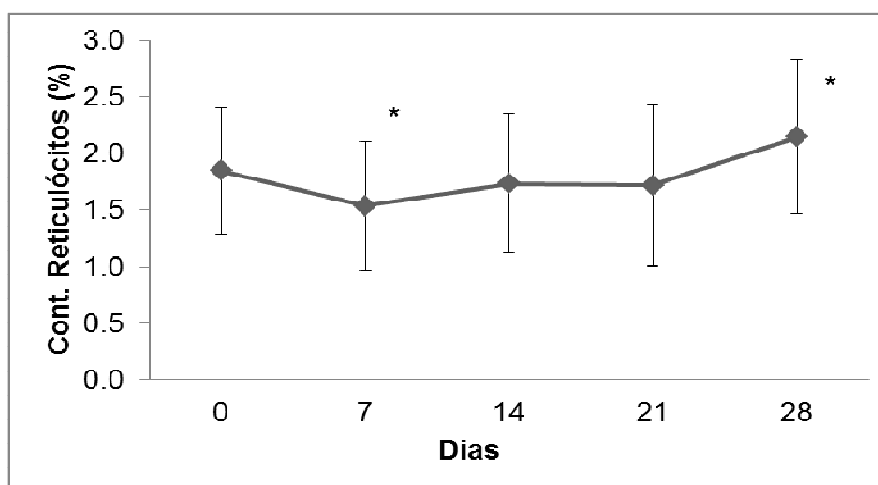


FIGURA 38 - CONTAGENS AUTOMATIZADAS DE RETICULÓCITOS POR TEMPO DE PRESERVAÇÃO DE ERITRÓCITOS EM MEIO CE, APÓS FIXAÇÃO PARCIAL EM GLUTARALDEÍDO

NOTA: As barras de erro representam os desvios padrão.

* Diferença estatisticamente significativa entre os dias 7 e 28 (teste de Tukey - $p < 0,05$). Cada ponto experimental é média aritmética de 10 amostras em triplicata.



6 DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A garantia da qualidade é obtida através de métodos sistemáticos que incluem análises a serem realizadas antes, durante e após o processo, a fim de avaliar todas as etapas do mesmo, possibilitando a detecção de erros, ao acaso ou sistemático, oportunizando minimizá-los, aumentando a probabilidade de obter resultados adequados. O emprego de padronização de técnicas, calibração de equipamentos, controle de qualidade interno e externo, é essencial para aumentar a confiabilidade nos resultados. (HAUSER, 2003b; TOMCZAK *et al.*, 2010).

A obtenção de resultados adequados depende diretamente da qualidade dos reagentes, da exatidão dos padrões, da precisão dos métodos aplicados, da busca incessante pelos resultados exatos, e engloba ainda a manutenção preventiva e corretiva dos equipamentos, limpeza dos materiais, adequação das técnicas, treinamento contínuo dos profissionais (NOVARETTI *et al.*, 2009).

O controle de qualidade analítico avalia e seleciona os métodos e os instrumentos considerados confiáveis. Todavia, para a implantação de um método ou equipamento, devem ser analisadas suas confiabilidade e viabilidade. A viabilidade está relacionada com a rapidez e o custo para desenvolver a metodologia e a confiabilidade depende da variabilidade introduzida pelos erros randômicos e sistemáticos (STIENE-MARTIN *et al.*; 1998).

Os programas de controle de qualidade em laboratórios clínicos incluem os internos e externos. Os externos são utilizados para adequar o sistema de controle interno de forma a torná-lo eficaz. Apesar de se empregar técnicas para assegurar a exatidão e a precisão, certos erros são detectados apenas através de uma avaliação externa (LEWIS *et al.*, 2006). A implementação de programas de controle de qualidade externo tem resultado em redução dos coeficientes de variação para diversos parâmetros medidos pelos analisadores hematológicos (TAKUBO & TATSUMI, 2001; XIAOBO *et al.*, 2003).

A partir de resultados obtidos em diversos trabalhos anteriores, deste mesmo grupo de pesquisa, demonstrou-se claramente que o meio CE é capaz de manter os eritrócitos estáveis com suas características físicas e químicas por até 60 dias, tendo inclusive, sido utilizado como veículo de preservação de suspensões de eritrócitos com determinações conhecidas para controle de qualidade dos valores do eritrograma (LEONART, 1994; HAUSER *et al.*, 2003b), informação esta que

fomentou a continuidade do seu estudo para outras análises, como a preservação de antígenos eritrocitários e reticulócitos.

Produzido com um baixo custo agregado e com uma metodologia de produção simples, na composição do meio CE empregam-se componentes diversos, entre eles nutrientes, como a glicose e fontes de íons; a albumina bovina, como estabilizadora da membrana celular e; etilenodiamino tetracetato de sódio, como quelante de íons cálcio (LEONART, 1994).

A hemoterapia é reconhecida como um dos mais importantes componentes do arsenal terapêutico disponível em situações de risco de vida. No entanto, falhas no processo podem acarretar danos ao paciente que, em alguns casos podem levar à morte. Por isto, tem-se buscado incessantemente o aumento da segurança transfusional. Para tanto, são relevantes, além da preservação adequada dos componentes sanguíneos e dos cuidados em relação à detecção de agentes contaminantes, a padronização de testes utilizados nos serviços hemoterápicos, ressaltando-se as técnicas e reagentes imuno-hematológicos. A busca pelo aprimoramento envolve a padronização de testes que comprovem a qualidade dos reagentes utilizados, incluindo a definição de critérios para aquisição, armazenamento e utilização dos mesmos (NOVARETTI *et al.*, 2002; TOMCZAK *et al.*, 2010).

Em imunoterapia há necessidade de triagem e identificação adequadas de antígenos eritrocitários e de seus anticorpos correspondentes presentes no plasma de pacientes e ou doadores, tanto para a seleção de sangue apropriado para transfusão como para a investigação de reações transfusionais, da doença hemolítica do recém-nascido e de outras doenças imuno-hemolíticas. De forma semelhante como em imuno-hematologia, a pesquisa de anticorpos específicos demanda a aquisição de hemácias fenotipadas. Os eritrócitos produzidos comercialmente para emprego em imuno-hematologia podem ser utilizados para tipagem reversa ABO, para a identificação e quantificação de anticorpos irregulares livres ou fixados em hemácias sensibilizadas, na forma de IgG. A validade dessas suspensões de hemácias fenotipadas produzidas a partir de amostras de sangue lavado para remover anticorpos e proteínas plasmáticas e ressuspensos em solução de Alsever modificada, variam quanto a estabilidade que fica entre 21 e 35 dias, sob refrigeração (4 a 5 °C) (NOVARETTI *et al.*, 2002).

Ao se pesquisar a preservação de hemácias é preciso observar os fatores limitantes que ocorrem durante o armazenamento. A perda da viabilidade das células vermelhas está associada com a "lesão de estoque" devida a várias alterações bioquímicas, como a diminuição do pH, acúmulo de ácido láctico, diminuição do consumo de glicose e diminuição nos níveis de ATP acompanhada da redução dos níveis de 2,3-BPG. Alterações na membrana levam à formação de esferócitos, podendo causar rompimento da mesma com conseqüente hemólise, o que leva ao aumento da hemoglobina extracelular (GRIMES, 1980; MERYMAN *et al.*, 1986; WEGNER *et al.*, 1987; LEONART, 1994).

O desenvolvimento de uma metodologia alternativa para conservação de eritrócitos fenotipados, que seja simples e acessível economicamente para que se possa empregá-la em imuno-hematologia, em especial se for possível aumentar o seu tempo de estabilidade em relação às suspensões de eritrócitos disponíveis comercialmente é relevante para o desenvolvimento de técnicas de controle de qualidade e pesquisa de anticorpos específicos, podendo contribuir para melhorar a qualidade de serviços de Análises Clínicas e de Hemoterapia.

Após a produção do meio CE, testou-se preliminarmente a capacidade do mesmo em manter a reatividade de alguns antígenos na superfície de eritrócitos preservados, frente à exposição aos seus anticorpos específicos. Além disto, testou-se a reatividade dos antígenos eritrocitários em amostras preservadas em meio CE após fixação parcial com glutaraldeído, porém com resultados insatisfatórios (dados não mostrados). Assim, observou-se que a fixação parcial com glutaraldeído não foi eficiente para a manutenção da reatividade destas estruturas antigênicas, possivelmente devido às modificações promovidas na membrana eritrocitária pelo glutaraldeído.

De posse destes resultados, adaptou-se a técnica de preparo das amostras de forma a se obter suspensões mãe de eritrócitos com volume globular de 40% para garantir a positividade da reação, bem como definiu-se os principais antígenos a serem testados, de acordo com a sua freqüência na população e grau de importância clínica (Tabela 1, p.33).

Os resultados mostrados nas Figuras 29 a 31 ilustram a manutenção da reatividade dos antígenos estudados, com diferentes graus de intensidade. Para os antígenos A, B, D, C^w, C, e, Jk^a, Le^b, Lu^b, M, N, a reatividade média foi de score 4, para os antígenos c, Jk^b, P1, Fy^a, Di^a, E, Kp^b foi de 3, e para o antígeno Fy^b, de 2.

Alguns autores verificaram que eritrócitos conservados em ACD e CPD mantêm a capacidade reativa contra seus anticorpos específicos por até 5 semanas (ROSENFELD, 1971; PECK, 1981).

Ao testar os antígenos do sistema S (S e s), resultados ilustrados nas Figuras 34 e 35, observa-se que houve um comportamento similar entre ambos, de acordo com o qual, mantiveram a aglutinabilidade durante em média 42 dias e, a partir daí, apresentaram decréscimo de reatividade de um grau e assim permaneceram até os 63 dias de preservação. Nas Figuras 32 e 33 demonstra-se que a reatividade dos antígenos do sistema Kell (K e k) apresentaram comportamento similar ao encontrado para os antígeno do grupo S, sendo que o K apresentou reatividade estável até o dia 21 e o k até o dia 14. A partir deste prazo, houve um decréscimo de aglutinabilidade de um grau. Amostras que, ao início da pesquisa apresentavam grau 4 de positividade aos 63 dias de preservação apresentavam grau 3, enquanto as que iniciaram com grau 3 terminaram com 2, e mantiveram esta reatividade até o dia 63. Outros autores conseguiram manter a reatividade dos antígenos eritrocitários dos sistemas MNSs e Kell, bem como ABO, Rh, durante 8 semanas em ADSOL (HEATON *et al.*, 1984).

Porém, os resultados apresentados acima estão em conformidade com os de outros autores, como na pesquisa sobre a estabilidade dos antígenos realizada por Snyder *et al.* (1983b), na qual a reatividade dos antígenos A, B, c, D, K, Le^a, Fy^a, M e P1, preservados em CPD e ADSOL, foi testada nos dias 0, 35, 42, 49 e 56. Tais autores obtiveram resultados nos quais a reatividade dos antígenos se manteve durante 8 semanas de preservação e, embora tenha ocorrido um decréscimo na reatividade dos antígenos M e P1, nenhum dos antígenos estudados apresentou perda total de reatividade em 56 dias. No presente trabalho, no entanto, o antígeno P1 manteve o grau de reatividade constante entre os dias 0 e 63 (Figura 30).

Em outra pesquisa, Snyder *et al.* (1983a) também encontraram perdas de reatividade ao estudar a estabilidade dos antígenos em amostras preservadas em CPD e CPDA2. A reatividade dos antígenos eritrocitários: A, B, c, D, K, Fy^a, Jk^a, Le^a, M e P, preservados em CPD, foi testada nos dias 0, 10 e 21 dias e; preservados em CPDA2 de forma similar, porém nos dias 0, 20 e 35. Os resultados mostraram que não houve mudanças significativas na reatividade dos antígenos, mas sim pequenos decréscimos para os antígenos A, B, c e M para amostras preservadas em CPD

entre os dias 0 e 21 e, para os antígenos c e M, nas amostras preservadas em CPDA2, entre os dias 0 e 35.

Para os antígenos do sistema Lewis (a e b), o antígeno Le^b apresentou estabilidade entre 0 e 63 dias, como ilustram as Figuras 28 e 29. Contudo, na pesquisa do antígeno Le^a, como ilustrado na Figura 36, pode-se observar que houve estabilidade na reatividade até o dia 14, seguida da perda de um grau e manutenção da positividade até o dia 63.

Os resultados encontrados neste trabalho para a reatividade dos antígenos eritrocitários são similares, em alguns aspectos, aos encontrados por Myhre *et al.* (1984) que, ao estudarem a preservação da reatividade dos antígenos A e B do sistema ABO; D, C, c, E, e do sistema Rh; Le^a e Le^b do sistema Lewis; e antígeno P1 do sistema P, em sangue preservado em diversas soluções (CPD, CPDA-1, SAG, Nutricel, em alguns casos acrescidas de solução aditiva AS-2) a 21 ou 35 dias de preservação, observaram que, para os antígenos estudados dos sistemas ABO e Rh não houve perda da reatividade, com exceção do antígeno D, que apresentou pequena redução, de 4+ para 3+. Porém, para os antígenos dos sistemas Lewis e P, houve um decréscimo de reatividade moderado. O antígeno P também perdeu parte da reatividade e, alguns casos, a perdeu totalmente. Estes autores argumentam que o fato de o antígeno Lewis poder eluir-se da célula com maior facilidade, por ser adsorvido à membrana, pode ocasionar a sua instabilidade.

Os painéis de eritrócitos comerciais não são suficientes para identificação de todos os antígenos, principalmente para os de menor incidência, apontando para o fato da necessidade de hemácias adicionais a serem obtidas de outros painéis ou células selecionadas para uma melhor determinação da possível especificidade de certos anticorpos, particularmente aqueles dirigidos para antígenos de baixa ou média frequência (GIRELLO & KUHN, 2002).

O desenvolvimento de técnicas efetivas de preservação de eritrócitos que mantém *in vitro* a viabilidade e função representam uma necessidade nas áreas da hemoterapia e da imuno-hematologia, a fim de possibilitar a realização de exames laboratoriais e controle de qualidade, fornecendo subsídios para diagnóstico, prevenção e conduta em casos de sensibilização associados à transfusão, gestação e transplante de órgãos.

A determinação da concentração de reticulócitos constitui-se em um exame de grande relevância, por fornecer uma indicação sobre a capacidade da medula

óssea, auxiliar no diagnóstico complementar de diversas doenças e no acompanhamento de muitas condições clínicas. A busca de opção para controle de qualidade interno e externo para este exame é necessária e foi um dos focos do presente trabalho, contribuindo para o estudo de soluções preservadoras capazes de manter suspensões de eritrócitos, incluindo os reticulócitos, estáveis para utilização em programas de controle de qualidade, fornecendo uma proposta alternativa mais acessível à maioria dos laboratórios clínicos, com a finalidade de estudar os resultados obtidos e, especialmente, detectar e minimizar os erros, com o propósito de promover análises fidedignas.

Neste trabalho, realizaram-se testes preliminares para o estudo de preservação de reticulócitos em meio CE, procedendo-se a contagens manuais de reticulócitos em amostras mantidas a 4 °C, no dia da coleta e após 2, 4, 6 e 8 dias (n=4) (dados não mostrados). Os valores obtidos mostraram uma diminuição de cerca de 50% após 2 dias de preservação. Verificou-se, assim, que, apesar das divergências encontradas pelos diversos autores em relação ao tempo em que as contagens de reticulócitos permanecem estáveis, é consenso que este tempo é curto. Deve-se considerar aí que o reticulócito, como célula jovem, se preservado em meios que mantenham seu metabolismo ativo, continuará seu processo de maturação.

O grau de hemólise dos eritrócitos durante a preservação constitui-se em fator limitante para o tempo de armazenamento e, depende do meio de suspensão em que estes se encontram. Resultados de trabalhos anteriores indicaram baixos índices de hemólise, com valores inferiores a 2% após 60 dias de preservação em meio CE e de menos de 1% após 90 dias de preservação de eritrócitos em meio CE após fixação parcial com glutaraldeído (LEONART, 1994). Desde os primeiros estudos sobre o armazenamento de eritrócitos até a atualidade, os autores têm considerado a taxa de hemólise espontânea como marcador fundamental da preservação (HÖGMAN & MERYMAN, 2006).

O glutaraldeído forma produtos estáveis, resistentes à hidrólise ácida, com efeitos variáveis sobre as atividades biológicas, estabelecendo ligações específicas entre grupos ϵ -amino da lisina e SH e, quando utilizado como fixador da membrana eritrocitária, promove a formação de oligômeros entre as moléculas protéicas (WOLFE, 1985, LEONART, 1994). A fixação parcial da membrana eritrocitária diminui a hemólise, com redução da deformabilidade e formação de oligômeros de

alto peso molecular por interações entre as proteínas da membrana (ARAKI & RIFKIND, 1981).

A partir do conhecimento de que a fixação parcial de eritrócitos com glutaraldeído inibe a hemólise e conserva diversas propriedades físicas e biológicas da célula, mantendo os eritrócitos com alterações mínimas na sua morfologia, em função da concentração, do tempo de fixação bem como da morfologia celular e do estado inicial das células (RUDENKO *et al.*, 1998); observou-se maior estabilidade dos eritrócitos preservados em meio CE fixados parcialmente com glutaraldeído, com manutenção dos valores do eritrograma durante até 100 dias (LEONART *et al.*, 1989; LEONART, 1994).

Desta forma, concluiu-se que a estabilidade da contagem de reticulócitos poderia ser dependente de um processo de fixação celular. Assim, neste trabalho, estabeleceu-se o uso de meio CE associado à fixação parcial com glutaraldeído, obtendo-se resultados satisfatórios (Tabelas 6 e 7).

Avaliou-se em seguida a capacidade de estabilização dos reticulócitos em amostras de eritrócitos suspensos em meio CE parcialmente fixados com glutaraldeído, utilizando para a determinação, a técnica manual, como demonstrado na Tabela 6, sendo que os resultados encontrados foram satisfatórios até o dia 28. Embora o decréscimo encontrado nos dias 35 e 42 tenha sido relativamente baixo, houve uma grande dificuldade na identificação dos reticulócitos ao microscópio pela técnica manual, tornando a pesquisa pouco aplicável.

Lampasso (1968), ao estudar a estabilidade de sangue colhido em EDTA e armazenado a 4 ou 23 °C em relação a diversas determinações hematimétricas, não encontrou diferenças significativas para as contagens de reticulócitos até 48 h após a coleta. Porém, de acordo com Tsuda & Tatsumi, (1990), os reticulócitos possuem estabilidade *in vitro* muito curta se o sangue é coletado e mantido nas condições rotineiras de laboratório. Estes autores recomendam que a contagem seja realizada dentro das primeiras 6 h após a coleta, se a amostra de sangue for colhida em EDTA e mantida à temperatura ambiente; ou dentro de 72 h, se refrigerada a 2 - 6 °C. Relatam que a proporção relativa de reticulócitos diminuiu, chegando a 60% do valor inicial após 3 semanas de armazenamento a 4 °C.

Peng *et al.* (2001), entretanto, observaram diminuição significativa mais brusca da concentração de reticulócitos para as contagens realizadas entre 1 e 48 h,

em relação a 30 min em sangue coletado em condições rotineiras e armazenado a 4º C.

Diversos trabalhos demonstraram a variabilidade de resultados quando se comparam resultados interobservadores, assim como na comparação entre contagens automatizadas. (SIMIONATTO *et al.*, 2010)

Segundo Riley *et al.* (2002), os comitês internacionais, após observarem os resultados obtidos em estudos feitos sobre a variação interlaboratorial para a contagem de reticulócitos de 1971, 1972 e 1974, que mostravam variações excessivas, realizaram um estudo para determinar o coeficiente de variação interobservadores pela metodologia manual, cujos resultados apresentaram variações entre 25 e 48%. Em 1984, fez-se novo estudo conduzido pelo CAP, com o objetivo de comprovar a variação interobservadores para a contagem manual de reticulócitos, obtendo-se coeficientes de variação de 26,2 a 32,4%.

Apesar disso, Koepke & Koepke (1986), observaram que a variabilidade interobservadores na identificação morfológica de reticulócitos continua a ser a principal causa da imprecisão do método. De acordo com Riley *et al.* (2002), em outros estudos já se havia demonstrado que a maior causa de imprecisão na contagem de reticulócitos é a incapacidade na sua identificação, uma vez que cerca de 60% dos reticulócitos presentes no sangue periférico apresentam poucos e discretos grânulos. Simionatto *et al.* (2009), também observaram variação interobservadores elevada, com erro casual de 4 a 60%.

Nas últimas décadas, houve uma crescente substituição da contagem manual de reticulócitos pela metodologia automatizada, em especial em países desenvolvidos. No entanto, em laboratórios com pequena ou média rotina, o custo-benefício deve ser observado. É importante registrar que o método manual para contagem de reticulócitos continua sendo o método de referência definido na NCCLS, de acordo com o documento H44-A (PIERRE, 2002), embora o CAP considere o método automatizado mais preciso, com base em relatos de coeficientes de variação de até 15 % (DAVIS, 1996).

A contagem de reticulócitos pelo princípio da citometria de fluxo é considerada um método reprodutível, simples, seguro e sensível. Porém, o custo do aparelho e dos reagentes ainda é um fator limitante para o seu uso na rotina. Sem dúvida, o uso da citometria de fluxo proporciona facilidades e vantagens sobre a microscopia de luz, porém a padronização dos valores de referência e o emprego de

amostras controle é necessário para assegurar a exatidão. Com o advento da contagem de reticulócitos automatizada e semi-automatizada, pode-se afirmar que houve melhoria na qualidade, visto que se conta um grande número de células, acima de 30.000 em alguns aparelhos. (SAXENA *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2008; LEONART, 2009).

Simionatto *et al.* (2010), compararam a contagem manual com a automatizada, encontrando diferenças muito pequenas entre ambas, com erro sistemático de 0,4% e erro randômico de 3,9%, e concluíram que estas metodologias, quando rigorosamente padronizadas, são confiáveis. Porém, padronizar técnicas, exclusivamente pode não ser suficiente. De acordo com Takubo & Tatsumi (2001), a acurácia dos aparelhos pode não ser suficiente para se encontrar o valor verdadeiro, mesmo que as contagens sejam feitas de acordo com as especificações dos fabricantes, o que torna importante o desenvolvimento de materiais biológicos de referência para controle de qualidade, bem como a implantação de programas de controle de qualidade interno e externo.

Os resultados das contagens de reticulócitos pela metodologia automatizada (Tabela 7), cujas contagens foram realizadas em triplicata, de acordo com a análise da variância, mostraram estabilidade durante 28 dias, com uma pequena flutuação e média geral de 1,8%, desvio padrão 0,64%, ou seja, apresentando exatamente a média dos valores iniciais, ou seja, do dia zero (Figura 38). O erro casual calculado pelo coeficiente de variação (Tabela 9) é de 20 %. Riley *et al.* (2002) descrevem que o CAP, em 1984, relatou um CV de 26,2 a 32,4 %. Portanto, o erro casual é compatível com o erro das contagens de reticulócitos, indicando que houve estabilidade durante o período de preservação de 28 dias.

As dificuldades na obtenção de amostras controle para contagem de reticulócitos residem na sua instabilidade. Desta forma, observa-se que é relevante a continuidade dos estudos relativos à padronização e ao controle de qualidade da contagem de reticulócitos, especialmente no que se refere ao controle de qualidade externo. Este trabalho pode vir a contribuir para a possibilidade de produção de amostras controle para contagem de reticulócitos, se efetuados estudos subseqüentes para a validação da técnica de preservação de reticulócitos em meio CE, parcialmente fixados em glutaraldeído.

Desta forma, os conhecimentos acumulados sobre o metabolismo dos eritrócitos e o seu envelhecimento *in vitro* permitiram, a partir de resultados de

pesquisas sobre a preservação de eritrócitos, obter amostras nas quais foi possível preservar antígenos eritrocitários durante 63 dias e reticulócitos, por 28 dias. Este conhecimento poderá vir a contribuir de forma significativa para a melhoria na qualidade de exames imuno-hematológicos e para a confiabilidade da quantificação de reticulócitos.

7 CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

A partir de análises realizadas em suspensões de eritrócitos durante até 63 dias de preservação em meio CE a 4°C, pode-se concluir que:

- ♦ os antígenos eritrocitários : A, B, D, C^w, C, c, E, e, kp^b, Jk^a, Jk^b P1, Le^b, Lu^b, M, N, Fy^a, Fy^b e Di^a, apresentaram reatividade constante frente a seus anticorpos específicos, durante 63 dias;
- ♦ os antígenos S e s, apresentaram estabilidade de reatividade durante o armazenamento com estabilidade constante até o dia 42, sendo que nos dias 49, 56 e 63 apresentaram decréscimo de aglutinabilidade de 1 grau (de 4+ para 3+ ou de 3+ para 2+) mantendo está reatividade até o dia 63;
- ♦ o antígeno K, apresentou estabilidade de reatividade frente a seus anticorpos específicos, com decréscimo de 1 grau (de 4+ para 3+ ou de 3+ para 2+) a partir do dia 28 e assim permaneceu durante os 63 dias de preservação;
- ♦ os antígenos k e Le^a, apresentaram estabilidade da reatividade frente a seus anticorpos específicos, com decréscimo de 1 grau de aglutinabilidade (de 4+ para 3+ ou de 3+ para 2+) a partir do dia 21, e mantiveram-se assim até o dia 63.

A partir de análises realizadas em suspensões de eritrócitos, durante 28 dias de preservação em meio CE após fixação parcial com glutaraldeído, armazenados a 4°C, pode-se concluir que:

- ♦ a concentração de reticulócitos se manteve estável durante 28 dias, com valores médios de 1,8 %, dp 0,64% com CV 20% (n=50) em contagens automatizadas.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se sugerir que a preservação de eritrócitos em meio CE pode manter a reatividade de antígenos eritrocitários por até 63 dias com resultados satisfatórios e; após fixação parcial com glutaraldeído, manter a contagem de reticulócitos estável por até 28 dias

Os resultados encontrados nesta pesquisa podem vir a contribuir para melhorar a qualidade de serviços de Análises Clínicas e de Hemoterapia.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ARAKI, K.; RIFKIND, J. M. The rate of osmotic hemolysis. A relationship with membrane bilayer fluidity. **Biochimica et Biophysica Acta**. Amsterdam: v. 645, p. 81-90, 1981.

A SÉRIE VERMELHA: **Células Eritróides – Progenitoras, precursoras, eritroblastos, reticulócitos e hemácias**. Disponível em: <http://misodor.com/SERIE%20VERMELHA.php>. Consultado em 05/10/2011.

ATTAULLAKHANOV, F. I.; KULIKOVA, E. V.; VITVITSKY, V. M. Reversible binding of anthracycline antibiotics to erythrocytes treated with glutaraldehyde. **Biotechnology Applied Biochemistry**. v. 24, p. 241-244, 1996.

BARRET, T. J. Improvement of the indirect hemagglutination assay for *Salmonella typhi* by use of glutaraldehyde-fixed erythrocytes. **Journal Clinical of Microbiology**, Washington, v. 22, p. 662-663, 1985.

BENCROFT, J.D.; STEVENS, E. **Theory and practice of histological techniques**, Churchill Livingstone, 1990.

BEUTLER, E. **Red cell metabolism: a manual of biochemical methods**. 3 ed. Orland: Grune & Stratton, 1984.

BONIFÁCIO, S. L., NOVARETTI, M. C. Z. Funções biológicas dos antígenos eritrocitários. **Rev. Bras. Hematologia e Hemoterapia**. v. 31(2). p. 104-111, 2009.

BRATOSIN, D.; ESTAQUIER, J.; AMEISEN, J. C.; MONTREUIL, J. Molecular and cellular mechanisms of erythrocyte programmed cell death: impact on blood transfusion. **Vox Sanguinis**, v. 83, p. 307 – 310, 2002.

BRUGNARA, C.; ZELMANOVIC, D.; SORETTE, M.; BALLAS, S. K.; PLATT, O. Reticulocyte Hemoglobin: An Integrated Parameter for Evaluation of Erythropoietic Activity. **American Journal Clinical Pathology**, USA, vol. 108, p: 133-142, 1997.

BUTTARELLO, M.; BULIAN, P.; FARINA, G.; PETRIS, M. G.; TEMPORIN, V.; TOFFOLO, L. Five Fully Automated Methods For Performing Immature Reticulocyte Fraction – Comparison in Diagnosis of Bone Marrow Aplasia. **American Journal Clinical Pathology**, USA, v.117, p. 871-879, 2002.

CANÇADO, R. D. Mieloma Múltiplo e anemia, **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro v. 29, n. 1, p. 67-76, 2007.

CARVALHO, F. H.; RECCO-PIMENTEL, S. M. **A célula, 2001**. Manole, São Paulo, 2001.

CHIN-YEE, I.; ARYA, N.; D'ALMEIDA, MARK S. The red cell storage lesion and its implication for transfusion. **Transfusion Science**, v. 18, n. 3, p. 447 – 458, 1997.

CICCHETTI D. V.; SPARROW, S. A. Developing criteria for establishing interrater reliability of specific items: applications to assessment of adaptive behavior. **Am J Ment Defic.** Sep; 86(2) p. 127-37, 1981.

COOMBS, R. A. A. Harnessing of red cells for immunoassays. **Medicine Laboratory Sciences.** London: v. 44, p. 66-72, 1987.

CORRY. W. D.; MEISELMAN, H. J. Modification of erythrocyte physicochemical properties by millimolar concentrations of glutaraldehyde. **Blood Cells.** Berlin: v. 4, p. 465-480, 1978.

DACIE, S. J. V.; LEWIS, S. M. **Hematología Práctica.** 3. ed., Barcelona: Ediciones Toray, 1965.

DANIELS, G.; BROMILOW, I. **Essential guide to blood groups.** 1 ed. Blackwell. Massachusetts, 2007.

DAVIS, B. H.; Clinical practice in reticulocyte testing. **CAP Today;** v.10, p.25– 28, 1996.

DERICK, L.H.; LIU, S. C.; CHISHTI, A. H.; PALEK, J. Protein immunolocalization in the spread erythrocyte membrane skeleton. **European journal of cell biology** v. 57, n. 2, p. 317 – 320, 1992.

DIAMED: **Imunohematologia – Gel Teste.** Disponível em: <http://www.diamed.com.br/Cmi/Pagina.aspx?121>. Consultado em 25/07/2011

DOENÇAS DOS ERITRÓCITOS: **Os Reticulócitos.** Disponível em: <http://www.ciencianews.com.br/doencaeritro/Reticul%F3citos%20-%205/reticulo.htm>. Consultado em 05/10/2011

EMENDÖRFER, F.; **Estudo de alternativas para a adição da fração plaquetária em amostras para controle de qualidade de determinações hematimétricas,** Curitiba, 1998. [Relatório Final Programa PIBIC-CNPq].

EMENDÖRFER, F.; **Estudo de alternativas para a adição da fração plaquetária em amostras para controle de qualidade de determinações hematimétricas.** Curitiba, 1999. [Relatório Final Programa PIBIC-CNPq].

EMENDÖRFER, F; CLARO, L. M., COMAR, S.R. NASCIMENTO, A. J. LEONART, M. S. S. Meio CE e glutaraldeído para o controle de qualidade na preservação de plaquetas para o controle de qualidade em hematimetria. **Revista Brasileira de Análises Clínicas,** Rio de Janeiro : v. 32, p. 117, 2000.

ESKELINEN, S.; SAUKKO, P. Effects of glutaraldehyde and critical point drying on the shape and size of erythrocytes in isotonic and hypotonic media. **Journal of Microscopy.** Oxford: v. 130, p. 63-71, 1983.

FAGIOLO, E.; MORES, N.; PELLICCETTI, A.; GOZZO, M. L.; ZUPPI, C.; LITTARRU, G. P. Biochemical parameters to assess viability of blood stored for transfusional use. **Folia Haematologica**, Leipzig: v. 113, p. 783-789, 1986.

FATOR Rh - Wikipédia, a enciclopédia livre. Disponível em: http://pt.wikipedia.org/wiki/Fator_Rh, Consultado em 28/07/2011.

FEISTLER, E. P; PROCHASKA, C. L.; NASCIMENTO, A. J.; LEONART, M. S. S. **Estabilidade de amostras de controle de qualidade para a avaliação laboratorial de eritrócitos e de plaquetas**. Anais do 12º Evento de Iniciação Científica da Universidade Federal do Paraná (12º EVINCI), v.1, p.218, 2004.

FEISTLER, E. P; NASCIMENTO, A. J.; LEONART, M. S. S. **Estabilidade de amostras de controle de qualidade para a avaliação laboratorial de eritrócitos e de plaquetas**. Anais do 13º Evento de Iniciação Científica da Universidade Federal do Paraná (13º EVINCI), v.1, p.366, 2005.

FERNANDÉZ, L. H.; GALLARDO, A.; GARCIA, G. Evaluación del recuento de reticulocitos por el sistema Coulter GEN-S. **Academia Biomédica Digital**, Facultad de Medicina – Universidade Central da Venezuela, nº 30, Enero-Marzo: 2007.

GARGIULO, D. S. **Sistema Rho (Lo que hay que saber)** Disponível em: http://www.aathi.com.ar/pdfs/sis_rh_lo_que_hay_que_saber.pdf; Consultado em 02/09/2011.

GUERRA, C. C. C. 50 anos da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto; v. 22, n. 2, p. 67, 2000.

GIRELLO, A.L.; KUHN, T. I. B. B. **Fundamentos da Imuno-Hematologia Eritrocitaria**. São Paulo: Senac, 2002.

GREER, J. P.; PARASKEVAS, F.; FOERSTER, J.; GLADER, B.; RODGERS, G. M.; ARBER, D. A.; MEANS, R. T. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 12 ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2009.

GRIMES, A T. **Human red cell metabolism**. Oxford : Blackwell, 1980.

HARMENING, D. M. **Técnicas Modernas em Banco de Sangue e Transfusão**. 4 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2006.

HARRIS, J. R. **Blood cell biochemistry**. London: Plenum Press, v. 3: Erythroid Cells. Cap. 7. 1991.

HAUSER, A. B. **Programa de controle de qualidade em hematologia: variações interlaboratoriais para eritrograma e plaquetas em Curitiba e Região Metropolitana – PR**. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná. 2003a.

HAUSER, A. B.; PROCHASKA, C. L.; NASCIMENTO, A. J.; LEONART, M. S. S. Análise de amostras preservadas para o controle de qualidade em hematologia em Laboratórios de Análises Clínicas de Curitiba e Região Metropolitana, PR. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 35, p. 123-126, 2003b.

HAUSER, A. B.; PROCHASKA, C. L.; NASCIMENTO, A. J.; LEONART, M. S. S. Programa de controle de qualidade em hematologia: variações interlaboratoriais para eritrograma e plaquetas em Curitiba e região metropolitana-PR. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, PR. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 36, p. 135-138, 2004.

HEATON, A.; MIRIPOL, J.; ASTER, R.; HARTMAN, P.; DEHART, D.; RZAD, L.; GRAPKA, B.; DAVISSON, W.; BUCHHOLTZ, D. H. Use of Adsol preservation solution for prolonged storage of low viscosity AS-1 red blood cells. **Br. J. Haematol.**, Oxford, v. 57, p. 467-478, 1984.

HESS, J. R. An update on solutions for red cell storage. **Vox Sanguinis**, Basel, v.91, n. 1, p. 13 – 19, 2006.

HESS, J. R.; GREENWALT, T. G. Storage of red cells: new approaches. **Transfusion Medicine Reviews**, Hamilton, v. 16, n. 4, p. 283 – 295, 2002.

HÖGMAN, C. F.; ERIKSSON, L.; ERICSON, A.; *et al.* Storage of saline-adenine-glucose-mannitol-suspended red cells in a new plastic container: polyvinylchloride plasticized with butyryl-n- trihexyl-citrate. **Transfusion**, Philadelphia, v. 31, n. 1, p. 26 – 29, 1991.

HÖGMAN, C. F.; MERYMAN, H. T. Red blood cells intended for transfusion: quality criteria revisited **Transfusion**, Philadelphia, v. 46, n. 1, p. 137 – 142, 2006.

HORIBA MEDICAL: Tecnologias. Disponível em:

<http://www.horiba.com/br/medical/technologies/> Acesso em 25/07/2011

JANDL, J. H. **Blood:** textbook of hematology. 2. ed. Boston: Brown and Company, p. 505-506, 1996.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular.** 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

KAUSHANSKY, K.; LICHTMAN, M. A.; BEUTLER, E. B.; KIPPS, T. J.; **Williams Hematology**, 8 ed, Mc Graw Hill Medical, Ney York, 2010.

KIRBY, S. L.; LECAK, J.; ACKER, J.P. Biopreservation of Red Blood Cells: Past, Present, and Future. **Transfusion Medicine Reviews.** v. 19, p. 127-142, 2005.

KLEINBONGARD, P. SCHULZ, R.; RASSAF, T.; *et al.* Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. **Blood**, New York, v. 107, n. 7, p. 2943 – 2951, 2006.

KLEIN, H. G.; ANSTEE, D.J.; **Mollison's blood transfusion in clinical medicine**; 11th ed; Blackwell; Massachusetts; 2005.

KLEIN, H.; SPAHN, D.; CARSON, J. Red blood cell transfusion in clinical practice. **The Lancet**, Oxford, v. 370, n. 9585, p. 415 – 426, 2007.

KLINKEN, S. P. Red blood cells. **The international journal of biochemistry & cell biology**, London, v. 34, n. 12, p. 1513-1518, 2002.

KOEPKE, J.F.; KOEPKE, J.A. Reticulocytes. **Clin Lab Haematol.** V. 8:169–79,1986.

LAMPASSO, J. A.; Changes in hematologic values induced by storage of ethylenediaminetetraacetate human blood for varying periods of time. **The American Journal of Clinical Pathology**, v. 38, n. 2, p. 443-447, 1968.

LEONART, M. S. S.; GRANATO, E. S.; NASCIMENTO, A. J.; HASHIMOTO, Y.; LEONART, R. Solução preservadora de eritrócitos para controle de qualidade do eritrograma. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. Rio de Janeiro: v. 18, p. 7-12, 1986.

LEONART, M. S. S.; SILVA, E. L.; STINGHEN, S. T.; NASCIMENTO, A. J. Amostra para controle de Qualidade do Eritrograma estável por 100 dias. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. Rio de Janeiro: v. 21, p. 111-113, 1989.

LEONART, M. S. S., NONOYAMA, K., NASCIMENTO, A. J., PELISSARI, C. B., STINGHEN, S.T., STINGHEN, A. D. M., BARRETO, O. C. O. Alterações bioquímicas durante a preservação de eritrócitos *in vitro* em meio CE com vitamina E. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro : 24(4): 91-94, 1992.

LEONART, M. S. S. **Estudos Sobre a Preservação de Eritrócitos**. São Paulo. 131f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) - Universidade de São Paulo, 1994.

LEONART, M. S. S.; NASCIMENTO, A. J.; NONOYAMA, K.; PELISSARI, C. B.; BARRETTO, O. C. O. Correlation of discocyte frequency and ATP concentration in preserved blood. A morphological indicator of red cell viability. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto SP, v. 30, p. 745-747, 1997.

LEONART, M.S.S. **Estudos sobre eritrócitos e plaquetas: preservação morfologia e fisiopatologia**. Curitiba. Tese aprovada em Concurso de Professor Titular na área da Análises Clínicas. Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná. 1999.

LEONART, M. S. S. A importância do controle de qualidade para a contagem de reticulócitos por métodos visual e automatizado. **Rev. Bras. Hematologia e Hemoterapia**, v.31, n.5, p. 303-304, 2009.

LEWIS, S. M.; BAIN, B. J.; BATES, I. **Hematologia Prática de Dacie e Lewis**; 9. ed. Artmed São Paulo – SP; 2006.

LORENZI, T. F. **Manual de Hematologia Propedêutica e Clínica**; 4 ed.; Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006a.

LORENZI, T. F.; **Atlas de Hematologia Clínica Hematológica Ilustrada**; Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006b.

NASCIMENTO, M. L. P. Importância do Volume Reticulocitário Médio para a Evidência da Macrocitose. **NewsLab**, São Paulo, v. 66, p. 130-145, 2004.

MARTINCIC, I.; MASTRONARDI, C.; CHUNG, A.; RAMIREZ-ARCOS, S.; Unexplained agglutination of stored red blood cells in Alsever's solution caused by the gram-negative bacterium *Serratia liquefaciens*; **Immunohematology**, v. 24 (2) p. 39-44, 2008.

MAY, J. M. Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane? **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, Bethesda, v. 13, p. 995-1006, 1999.

MERYMAN, H.T.; HORNBLOWER, M.L.S.; SYRING, R.L. Prolonged storage of red cells at 4°C. **Transfusion**, Philadelphia : v. 26, p. 500-505, 1986.

MOHANDAS, N.; CHASIS, J. A. red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. **Seminars in Hematology**, New York, v. 30, p. 171 – 192, 1993.

MORGAN, L. O., JONES, W. G., FISHER, J. O., CAUVIL, T. A whole blood control for the Coulter models. **J. Clin. Pathol.**, London, v. 31, p. 50-53, 1978.

MURADOR, P.; DEFUNE, E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. **Rev. Bras. Hematologia e Hemoterapia**. v. 29 (2) Apr./June, 2007.

MYHRE, B. A.; DEMANIEW, S.; NELSON, E. J. Preservation of red cell antigens during storage of blood with different anticoagulants, **Transfusion**, v. 24: 499-501, 1984.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS/INTERNATIONAL COMMITTEE FOR STANDARDIZATION IN HAEMATOLOGY: **Methods for reticulocyte counting (Flow Citometry and Supravital Dyes). Approved guideline**. NCCLS document H44-A. Villanova, PA: NCCLS, 1997.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 4 Ed. Sarvier; São Paulo; 2006

NORONHA, J. F. A.; GROTO, H. Z. W. Reticulócitos imaturos como preditores precoces do sucesso do enxerto no transplante de medula óssea alogênica e autólogo. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 1, p. 61-62, 2002.

NOVARETTI, M. C. Z.; BUENO, V. J.; DORLHIAC-LLACER, P. E.; CHAMONE, D. A. F. Controle de qualidade interno de reagentes em imunohematologia - Aspectos práticos. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v. 24, n. 04, p. 270-85, 2002

NOVARETTI, M. C. Z.; BONIFÁCIO, S. L.; MEDEIROS, V. R.; RUIZ, A. S.; DORLHIAC-LLACER, P. E.; CHAMONE, D. A. F. Dez anos de experiência em controle de qualidade em imuno-hematologia. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v. 31(3):160-165, 2009.

PARKER, J. C. Glutaraldehyde fixation of sodium transport in dog red blood cells. **Journal of General Physiology.** New York: v. 84, p. 789-803. 1984.

PECK, C. C.; MOORE, G. L.; BOLIN, R. B. Adenine in blood preservation. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**; Cleveland, v. 13, p. 173-212, 1981.

PENG, L.; YANG, H.; JIANG, H.; SU, J.; PENG, Z. Automated reticulocyte counting using the Sysmex RAM-1; **Clin. Lab. Haem.** v. 23, 97-102, 2001.

PEREIRA, P. M.; SEKI, M. C.; PALMA, P. V. B.; MORAIS, F. R.; SANTANA, A. E.; PEREIRA, G. T. Contagem de reticulócitos de cães saudáveis ou anêmicos pela citometria de fluxo; **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.1, p.66-70, 2008.

PIERRE, R. V. Reticulocytes Their Usefulness and Measurement in Peripheral Blood. **Clinics in Laboratory Medicine**, California, v. 22, n. 1, p. 63-79, 2002.

PROCHASKA, C.L. **Estabilidade de amostras de controle de qualidade para a avaliação laboratorial de eritrócitos e de plaquetas.** Curitiba. Relatório final de Bolsa de Iniciação Científica apresentado ao Programa PIBIC-CNPq/UFPR. 2001.

PROCHASKA, C. L.; CLARO, L. M.; HAUSER, A. B. NASCIMENTO, A. J.; LEONART, M. S. S.; Estudo de meios de preservação de eritrócitos e de plaquetas para controle de qualidade em hematimetria. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro : v. 34, p. 23B, 2002.

PROCHASKA, C.L. **Estabilidade de amostras de controle de qualidade para a avaliação laboratorial de eritrócitos e de plaquetas.** Curitiba. Relatório final de Bolsa de Iniciação Científica apresentado ao Programa PIBIC-CNPq/UFPR. 2003.

Puro Sangue: História da transfusão de sangue. Disponível em: <http://purosangue.wordpress.com/historia-da-transfusao-de-sangue/> Consultado em 25/07/2011.

Red Gold: the epic history of blood. *Mirror of the soul – 2500 BCE – 999 CE.* Available from: <http://www.pbs.org/wnet/redgold/history/timeline1.html>. Consultado em 25/07/2011.

RED CELL BIOLOGY: **Erythropoiesis, Apoptosis, and Metabolism.** Disponível em: <http://faculty.washington.edu/calvoc/DocumentsLabM321/Lectures/3RBC.ppt> Consultado em 25/07/2011.

RELMA COMERCIAL: **Cubeta Citometria de Fluxo** – Hellma GmbH. Disponível em: <http://www.relma.com.br/hellma/citometria.html>. Consultado em 25/07/2011

RILEY, R. S.; BEM-EZRA, J. M.; TIDWELL, A. Reticulocyte enumeration: Past & Present. **Laboratory Medicine**, USA, v.10, n.32, 2001.

RILEY, R. S.; BEM-EZRA, J. M.; TIDWELL, A.; ROMAGNOLI, G. Reticulocyte analysis by flow cytometry and other techniques. **Hematology Oncology Clinics of North America**, USA, v. 16, p. 373-420, 2002.

ROSENFELD, R. E.; BERKMAN, E. M.; NUSBACHER, J.; HYAMS, L.; DABINSKY, C.; STUX, S.; HIRSCH, A.; KOCHWA, S. Specific agglutinability of erythrocytes from whole blood stored at 4 °C; **Transfusion**. Philadelphia, v. 11; p. 176-193, 1971.

RUDENKO, S. V.; CROWE, J. H.; TABLIN, F. Determination of time-dependent shape changes in red blood cells. **Biochemistry**. Moscow: v. 63, p. 1385-1394. 1998.

SALMAZO NEIVA, F.; ZOWTYI, D.T.; NASCIMENTO, A.J.; LEONART, M.S.S. **Preservação de Eritrócitos e Plaquetas e Controle de Qualidade de Componentes do Sangue para Hemoterapia** . Anais do 14º Evento de Iniciação Científica da Universidade Federal do Paraná (14º EVINCI), v.1, p.381, 2006.

SALMAZO NEIVA, F.; NASCIMENTO, A.J.; LEONART, M.S.S. **Estudo da estabilidade de suspensões de eritrócitos e plaquetas em diversos meios para o controle de qualidade em hematimetria**. Anais do 15º Evento de Iniciação Científica da Universidade Federal do Paraná (15º EVINCI), v.1, p. 422, 2007.

SALMAZO NEIVA, F., LEONART, M. S. S., NASCIMENTO, A. J., GUERIM, H. **Preservação de Eritrócitos e Plaquetas e Controle de Qualidade de Hemocomponentes para Hemoterapia**. 16º EVINCI - Evento de Iniciação Científica da Universidade Federal do Paraná, 2008, Curitiba. Livro de Resumos - 16.º EVINCI e 1.º EINTI / Outubro / 2008. Curitiba: UFPR, v.1. p. 278. 2008

SAXENA, R.; KATOCH, S.C.; SRINIVAS, U.; RAO, S.; ANAND, H. Impact of external haematology proficient testing programme on quality of laboratories. **Indian J Med Res**. v.126, p. 428-32, 2007.

SCOTT, K.; LECAK, J.; ACKER, J. Biopreservation of Red Blood Cells: Past, Present, and Future. **Transfusion Medicine Reviews**, Hamilton, v. 19, n. 2, p. 127 – 142, 2005.

SHONAT, R. D.; JOHNSON, P. C. Oxygen tension gradients and heterogeneity in venous microcirculation: a phosphorescence quenching study. **The American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 272, n. 5, s. 2, p. h2233 – h2240, 1997.

SILVA, C. R. G.; JORGE, A. O. C.; HIRTSCH, I. M. V. Aloanticorpo anti-Diego (a) em gestante; **Rev. Bras. Hematologia e Hemoterapia**; 26(4): 285-287, 2004.

SILVA, P. H.; HASHIMOTO, Y. **Interpretação Laboratorial do Eritrograma**. Lovise, São Paulo, p. 17-23, 1999.

SILVA, P. H.; HASHIMOTO, Y. **Interpretação Laboratorial do Leucograma**. Robe, São Paulo, 2003.

SIMIONATTO, A.; PAULA, J. P.; NASCIMENTO, A. J.; LEONART, M. S. S.; CICCHETTI, D. Analysis of manual reticulocyte counts in the clinical laboratories of Ponta Grossa and Campos Gerais, PR, Brazil, **Rev. bras. hematologia e hemoterapia** 31(5):315-320, 2009.

SIMIONATTO, A.; PAULA, J. P.; CHAVES, M. A. F.; BORTOLOSO, M; CICCHETTI, D.; LEONART, M. S. S.; NASCIMENTO, A. J. Manual and automated reticulocyte counts. **Hematology**, v. 15, n. 8, p. 406-409, 2010.

SIMMONS, A. **HEMATOLOGY: A Combined Theoretical and Technical Approach**. 2. ed., EUA: Butterworth-Heinemann, 1997.

SOARES, B.M.D. **Política Nacional de Hemoderivados** – Desafios e Perspectivas. 90p. Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, 2002.

STIENE-MARTIN, E.A. *et al.* **Clinical Hematology - Principles, Procedures, Correlations**; New York, Lippincott Williams & Wilkins, p. 817, 1998.

STRYER, L. **Biochemistry**. 4. ed. New York: W. H. Freeman and Company. p. 131-135, 1995.

SNYDER, E. L.; HEZZEY, A.; WEIRICH, D. F.; MOSHER, W.; DAVISSON, W.; BUCHHOLZ, D. H. Stability of red cell antigens and plasma coagulation factors stored in new formulation plastic blood containers, **Transfusion**, v. 23: 49-53, 1983a.

SNYDER, E. L.; HEZZEY, A.; JOYNER, R.; DAVISSON, W.; BUCHHOLZ, D. H. Stability of red cell antigens during prolonged storage in citrato-phosphate-dextrose and a new preservative solution, **Transfusion**, v. 23: 165-166, 1983b.

TSUDA, I.; TATSUMI, N. Reticulocytes in human preserved blood as control material for automated reticulocyte counters. **Am J Clin Pathol**. v. 93(1):109-10, 1990.

TAKUBO, T.; TATSUMI, N. Comparison of various reticulocyte counting methods and the standardization of reticulocyte counting. **Rinsho Byori**. v. 49(5):475-9, 2001

TOMCZAK, A. C. T. Q.; GRILO, K. T. M. ; CASTRO, J. M. ; MACHADO, A. M. B.; LEONART, M. S. S.; NASCIMENTO, A. J. Estudo de métodos laboratoriais para o controle de qualidade de unidades transfusionais eritrocitárias no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (Hemepar), Brasil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.32, n.3, p.209-214, 2010.

WALLACH, J. **Interpretação de Exames de Laboratório**, 6. ed., Rio de Janeiro: Medsi, p. 358 e 404, 1999.

WEGNER, G.; KUCERA, W.; LERCHE, D. Deformability characterization of erythrocyte stored different resuspension media. **Folia Haematologica**, Leipzig : v. 114, p. 474-477, 1987.

WICKRAMASINGHE, S. N.; BAIN, B. F. **Blood and Bone Marrow**, 3. ed., New York: Churchill Livingstone, v. 2, 1986.

WOLFE, L. C. The membrane and the lesions of storage in preserved cells. **Transfusion**, v. 25, p. 185-203, 1985.

XIAOBO, H.; YONG, L.; DAMING, J.; LEI, X.; YING, S.; JINFENG, Z. External quality assessment of automated hematology analyzer performance using fresh human blood samples in Shanghai. **Lab Hematol**. v. 9(3):175-8. 2003.

ZANDECKI, M.; GENEVIEVE, F.; GERARD, J.; GORDON, A. Spurious counts and spurious resultsnon haematology analysers: a review. Part II: white blood cells, red cell indices and reticulocytes. **International Journal of Laboratory Haematology**, England. v. 29, p. 21-41, 2007.



ANEXOS

ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: Estudo sobre a preservação de eritrócitos humanos para emprego em exames imuno-hematológicos e controle de qualidade para a contagem de reticulócitos

Investigador responsável: Zeni Vogler – bioquímica do Laboratório Geral Alfredo Berger – Secretaria Municipal de Ponta Grossa.

Local da pesquisa: Laboratório de Citologia e Hematologia Clínica e Laboratório Escola - UFPR

Telefone para contato: (41) 3360-4084 ou (41) 3360-4088, de segunda a sexta, das 8 às 12h e das 13 as 17h.

Telefone celular: (42) 8812-8255, horário comercial

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto “Estudo sobre a preservação de células para controle de qualidade em laboratório Clínico”, coordenado pela pesquisadora Zeni Vogler.

Este projeto tem por objetivo estudar aspectos da preservação de células em materiais biológicos com a finalidade de obter amostras estáveis para transporte e controle de qualidade em análises clínicas.

Para participar, você deve autorizar a coleta de seu sangue, único momento de desconforto. Esse será identificado com um código, portanto seu nome não será divulgado. Não haverá benefício direto aos voluntários, mas sim indiretos, por proporcionar avanços científicos relacionados as técnicas de análise para diagnóstico em laboratório de análises clínicas.

Sua participação é voluntária. Você pode se recusar a participar ou retirar o seu consentimento sem penalização. Lembrando que não haverá nenhum custo ou benefício financeiro a você pela participação no estudo.

Todos os dados coletados serão mantidos de forma confidencial. Os dados coletados serão usados para a avaliação do estudo. Membros das Autoridades de Saúde ou do Comitê de Ética podem revisar os dados fornecidos. Os dados também podem ser usados em publicações científicas sobre o assunto pesquisado. Porém, sua identidade não será revelada em qualquer circunstância. Se

qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida.

Se tiver alguma dúvida com relação ao estudo, você poderá entrar em contato com os pesquisadores pelos telefones citados. Estão garantidas todas as informações que você queira, antes, durante ou depois do estudo.

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que eu posso interromper minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito.

NOME DO PACIENTE

ASSINATURA

DATA

NOME DO RESPONSÁVEL
(Se menor ou incapacitado)

ASSINATURA

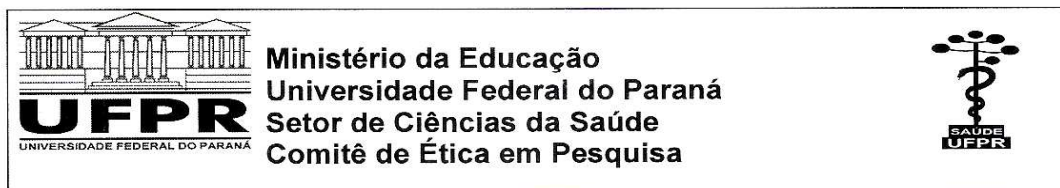
DATA

NOME DO INVESTIGADOR

ASSINATURA

DATA

ANEXO 2 PROTOCOLO CEP/SD



Ministério da Educação
Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa

Curitiba, 06 de novembro de 2009.

Ilmo (a) Sr. (a)
Zeni Vogler

Nesta

Prezado(a) Pesquisador(a),

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “**Estudos sobre a preservação de células para controle de qualidade em laboratório clínico**” está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 28 outubro de 2009 e apresentou pendência(s). Pendência(s) apresentada(s), documento(s) analisado(s) e projeto aprovado em 06 de novembro de 2009.

Registro **CEP/SD**: 814.149.09.10

CAAE: 0068.0.091.000-09

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do relatório final ou parcial: 06/05/2010.

Atenciosamente

Profª. Drª. Liliana Maria Labronici
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

Profª. Dra. Liliana Maria Labronici
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa - SDUFPR

Rua Padre Camargo, 280 – Alto da Glória – Curitiba-PR – CEP 80060-240
Fone: (41)3360-7259 – e-mail: cometica.saude@ufpr.br

Anexos